UNIVERSITATEATA DE VEST"VASILE GOLDIS" ARAD

BIOLOGIA MOLECULARĂ A MEDICAMENTULUI

Arad 2009

PREFAȚĂ

Biologia moleculară este implicată major în cercetările privind noile strategii terapeutice. Astfel, dacă se identifică gena/proteina care se află la originea unei maladii ereditare sau dobândite există posibilitatea descoperirii unor noi piste pentru "concepția" unor medicamente destinate să reducă deficitele sau excesele de activitate a acestei gene/proteine. De exemplu,în cazul anomaliei unui anumit receptor (proteină a suprafeței celulare destinată să transmită mesajul extern la structurile celulare interne) care determină o anumită maladie este posibilă concepția şi dezvoltarea unor molecule ,viitoare medicamente, capabile să acționeze specific asupra receptorului sau să suplinească funcția deficitară a acestuia printr-o altă cale. Cercetările efectuate asupra moleculelor terapeutice se bazează acum pe tehnici de modelare a moleculelor asistate pe calculator, pe sinteza unor analogi de sinteză a acestor molecule şi pe teste de selecție de nivel înalt ale acestor numeroşi analogi. Ansamblul acestor tehnici va permite ,în timp record, o selecție a eficacității terapeutice a unei anumite ținte dintre numeroasele molecule candidate.

În prima parte a cărții pe baza studiului molecular, mai precis al semnalelor moleculare, sunt analizate diferite tehnologii de testare celulară. Şi, când amintim de aceste tehnici ne referim nu doar la simpla detectare a unui singur produs celular ci la urmărirea unei mari varietăți de procese metabolice având drept scop final caracterizarea fenotipică multidimensională a comportamentului celular. Cel de al doilea capitol familiarizează cititorul cu modelele genelor knock-out, o tehnică care ne permite să creem şi să introducem un model de mecanism patologic într-un organism complex urmărind astfel să obținem un instrument analitic cu relevanță crescută în biologia moleculară a medicamentului. Următorul capitol prezintă detaliile unei tehnici de analiză moleculară axată pe aşa-numitele "gene reporter".

Descifrarea recentă a genomului uman a oferit un nou sprijin întregii arii de cercetare. Dintr-o dată un număr mare de ținte moleculare puteau fi supuse analizei. Mai întâi trebuie să răspundem la întrebarea: ce realizează această moleculă țintă la nivelul proceselor biochimice celulare şi cum este ea controlată? Acestei întrebări îşi propune să raspundă capitolul 4, care se ocupă de receptorii "orfani" cuplați cu proteina G (GPCR) şi încearcă implicit să prezinte noi provocări şi oportunități în găsirea unor noi liganzi cu efecte biologice încă necunoscute.

Cea de-a doua parte a acestei cărți este dedicată în întregime procesului de sinteză a medicamentelor. Două arii de interes major pot beneficia enorm în urma cercetării procesului de sinteză în cadrul biologiei moleculare şi utilizării în acest scop a tehnicilior corespunzătoare: elucidarea sintezei stereoselective a compuşilor naturali şi analogilor lor şi sintetizarea compuşilor

farmacologici derivați din ADN sau proteine. Primul capitol al acestei părți secunde oferă o privire de ansamblu, cuprinzătoare, despre utilizarea enzimelor în sinteza stereoselectivă, implicând utilizarea tehnicilor de recombinare genetică. Domeniul fascinant al produşilor farmacologici care interacționează cu acizii nucleici, structura şi sinteza acestora, agoniştii lor şi mecanismele de acțiune fac obiectul capitolului 6.

Partea a treia prezintă metodele analitice implicate în determinarea interacțiuni medicament-țintă. În acest sens se discută utilizarea proteinelor în cromatografia de afinitate şi enantioseparare a enantiomerilor (moleculă parte a unui compus alcătuit din două molecule din care una este imaginea în oglindă a celeilalte fără să fie identică cu ea). Utilizarea rezonanței magnetice nucleare (NMR) şi a tehnicilor înrudite în studiul structurilor moleculare este un alt subiect din această parte a cărții.

Elementele de cinetică, metabolism,şi toxicologie implicate în domeniile farmacogenomicii şi toxicogenomicii constituie partea finală a acestei cărți.

Acum ştim că o maladie este rezultatul combinat a sute de proteine şi în acest context este dificil să sperăm că vom găsi un principiu unic activ capabail să vindece boala. Într-adevăr, din 100 de medicamente care depăşesc stadiul de testare pe om , numai trei ajung pe piață. Celelalte se vor dovedi a fi toxice sau ineficiente. Probabil că toate țintele “bune” asupra cărora un medicament poate să exercite un efect au fost deja găsite. Ceea ce presupune că pentru a produce noi medicamente trebuie să se revină la cele vechi, care vor fi altfel reutilizate. Ca şi natura, cercetătorii vor face cu ajutorul biologiei moleculare, noul din vechi.

Autorii

CUPRINS

CUVÂNT ÎNAINTE 7

PARTEA I: CARACTERIZAREA MOLECULARĂ A INTERACȚIUNILOR MEDICAMENT-ȚINTĂ 10

1. TESTELE CELULARE: UTILIZAREA ŞI IMPACTUL LOR ÎN DESCOPERIREA MEDICAMENTELOR 10
1.1. Introducere 10
1.2. Proteinele membranare şi răspunsurile celulare rapide 16
1.3. Evaluarea expresiei genelor şi proteinelor în cadrul unor sisteme de analiză de mare capacitate 27
1.4.Reacțiile celulare spațio-temporale şi analizele subpopulațiilor 37
1.5. Analizele fenotipice 49
2. IMPLICAREA GENELOR KNOCKOUT ÎN ÎNȚELEGEREA MECANISMELOR BOLII ŞI DEZVOLTAREA UNOR NOI STRATEGII TERAPEUTICE 58
2.1. Introducere 58
2.2. Gene knockout la şoareci 59
2.3. Expresia genelor țesut specifice 70
2.4. Şoareci transgenici 77
2.5. Lezarea genelor țintă la Drosophila 79
2.6. Inactivarea genelor țintă la peştele zebră 81
2.7 . Deleția tulpinilor țintă de Caenorhabditis elegans 82
3. SISTEME DE TESTE BAZATE PE GENE REPORTER CARE INVESTIGHEZĂ RECEPTORII CUPLAȚI CU PROTEINA G IMPLICAȚI ÎN DESCOPERIREA DE NOI MEDICAMENTE 84
3.1. Receptorii şi comunicarea celulară 84
3.2. Afinitatea şi activitatea liganzilor GPCR 90
3.3. Rolul factorilor de transcripție în expresia genelor 91
3.4. Genele reporter 94
3.5. Sisteme de teste bazate pe gene reporter pentru investigarea GPCRs 102
4. DE LA GENOMUL UMAN LA NOILE MEDICAMENTE: POTENȚIALUL RECEPTORILOR ORFANI CUPLAȚI CU PROTEINELE G 109
4.1.Introducere 109
4.2. GPCRs şi genomul uman 111
4.3. Investigarea liganzilor 116
4.4. Screeningul pentru liganzi oGPCR folosind teste funcționale 124
4.5. Perspective 137

PARTEA A II-A: SINTEZA MEDICAMENTELOR PE BAZA ENZIMELOR ŞI ACIZILOR NUCLEICI 140

5.SINTEZA STEREOSELECTIVĂ A MEDICAMENTELOR CU AJUTORUL ENZIMELOR RECOMBINANTE 140
5.1. Sinteza stereoselectivă înainte de apariția ingineriei genetice 140
5.2. Metode clasice de îmbunătățire a tulpinilor pentru sinteza stereoselectivă 144
5.3. Ingineria genetică şi apariția enzimelor recombinante pentru sinteza stereoselectivă 146
5.4. Antibioticele β-lactamice 149
5.5. Antibioticele poliketide 157
5.6. Vitaminele 160
5.7.Steroizii 167
5.8. Alte medicamente 168

5.9. Concluzii 172
6. MEDICAMENTE PE BAZĂ DE ACIZI NUCLEICI 173
6.1. Introducere 173
6.2. Sinteza chimică a oligonucleotidelor 174
6.3. Modificări chimice ale oligonucleotidelor 176
6.4. Mecanismul de acțiune 186
6.5. Identificarea poziționării situsurilor accesibile ribozimelor la nivelul ARN țintă 198
6.6. Distribuirea exogenă a ribozimelor 199
6.7. Aplicațiile oligonucleotidelor în inhibarea expresiei genelor 202
6.8. Concluzii 203

PARTEA III: METODE ANALITICE IMPLICATE ÎN PRODUCEREA ŞI UTILIZAREA MEDICAMENTELOR 204
7. TENDINȚE RECENTE ÎN ENANTIOSEPARAREA MEDICAMENTELOR CHIRALE 204
7.1. Introducere 204
7.2. Situația actuală a dezvoltării şi utilizării medicamentelor chirale 208
7.3. Rolul tehnologiilor de separare în producerea, cercetarea şi utilizarea medicamentelor chirale 211
7.4. Prepararea medicamentelor enantiomeric pure 212
7.5. Bioanaliza medicamentelor chirale 225
7.6. Perspective 238
8. CROMATOGRAFIA DE AFINITATE: APLICAȚII ÎN BIOFARMACEUTICĂ 239
8.1. Introducere 239
8.2. Principiile cromatografiei de afinitate 240
8.3. Ligandul 243
8.4. Matricea de afinitate 249
8.5. Principii de operare 254
8.6. Modele de cromatografie de afinitate 256
8.7. Aplicațiile interacțiunilor de afinitate 265
9. IDENTIFICAREA MEDICAMENTELOR PE BAZA REZONANȚEI MAGNETICE NUCLEARE 281
9.1. Introducere 281
9.2. Relația structură-activitate (SAR) prin RMN 282
9.3. Monitorizarea moleculelor mici 294
9.4. Concluzii 308
10. MARCAREA PROTEINELOR CU IZOTOPII C^{13} ŞI N^{15} PENTRU ANALIZA STRUCTURII ŞI DINAMICII MACROMOLECULELOR BIOLOGICE 310
10.1. Introducere 310
10.2. Sisteme de expresie ale încorporării *in vivo* a izotopilor C^{13} şi N^{15} în proteine 312
10.3. Marcarea izotopică acelulară 328
11. UTILIZAREA FRAGMENTELOR DE ANTICORPI CA MEDIATORI AI CRISTALIZĂRII PROTEINELOR MEMBRANARE ÎN VEDEREA DESCOPERII DE NOI MEDICAMENTE 344
11.1. Introducere 344
11.2. Cristalizarea proteinelor membranare mediată prin fragmente de anticorp 348
11.3. Concluzii 367

PARTEA IV: ELEMENTE DE CINETICĂ, METABOLISM ŞI TOXICOLOGIE ALE MEDICAMENTELOR 368
12. FARMACOGENETICA: EFECTUL VARIANTELOR GENETICE ÎN DISPONIBILITATEA ŞI RĂSPUNSUL MEDICAMENTELOR 368
12.1. Considerații generale 368

12.2. Relaţii între genotip şi fenotip....369
12.3. Stabilirea relaţiilor între genotip şi fenotip....371
12.4. Fenotiparea versus genotipare şi predicţia răspunsului individual la medicamente....374
12.5. Polimorfismul genetic al enzimelor de metabolizare a medicamentelor (DMEs)....376
12.6. Polimorfismul CYP2D6....381
12.7. Polimorfsmul genetic al transportorilor de medicamente....385
12.8. Gena de rezistenţă multiplă la medicamente (MDR) – marker versus polimorfismul funcţional....385
12.9. Polimorfismul genetic al ţintelor medicamentelor....387
12.10. Concluzii....391
13. FARMACOGENOMICA BIODISPONIBILITĂŢII ŞI ELIMINĂRII MEDICAMENTELOR....393
13.1. Introducere....393
13.2 Contribuţia metabolismului la clearance-ul medicamentelor....394
13.3. Transportorii medicamentelor: Glicoproteina P (P-gp)....404
13.4. Concluzii....408
14. TOXICOGENOMICA: INTEGRAREA NOILOR METODE PROPRII BIOLOGIEI MOLECULARE ÎN TOXICOLOGIE....409
14.1. Dezvoltarea toxicologiei....409
14.2. Genomica funcţională: noi tehnologii ale biologiei moleculare....411
14.3. Integrarea tehnologiilor genomice funcţionale în toxicologie....423
14.4. Aplicaţiile toxicogenomicii în studiul mecanismului hepatotoxicităţii indusă de bromobenzen....428
14.5. Concluzii....430
15. IMPORTANŢA POLIMORFISMULUI GENETIC ŞI A INTERACŢIUNILOR MEDICAMENTOASE ÎN TRATAMENTUL DURERII....431
15.1. Introducere....431
15.2. Polimorfismul genetic:efectele asupra diferitelor analgezice....434
15.3. P-gp:un alt exemplu al variabilităţii genetice....448
15.4. Fenotipaj şi genotipaj: perspective....450
15.5. Concluzii....453
BIBLIOGRAFIE....454

CUVÂNT ÎNAINTE

Progresul uriaş înregistrat de biologia moleculară de-a lungul ultimelor decenii a condus la dezvoltarea a numeroase metode de cercetare inovatoare cu impact implicit asupra descoperirii şi dezvoltării de noi agenţi farmacologici.

Tehnicile moderne de identificare şi validare a unor molecule ţinte pe de o parte şi descoperirea şi ulterior descrierea de noi medicamente şi mecanisme de acţiune pe de cealaltă parte necesită un spectru extrem de larg de metode şi tehnici care depăşeşte cu mult repertoriul metodologiilor clasice . Descrierea moleculară detaliată a interacţiunii medicament - moleculă ţintă este la fel de importantă şi solicitantă ca şi cunoaşterea interacţiunii medicament – întregul sistem fiziologic. Acum ne sunt la îndemână conceptele şi informaţiile despre transportul medicamentelor, metabolismul şi stabilitatea acestora. De asemenea, putem să prezicem şi să determinăm modalitatea de reacţie a întregului sistem la administrarea unui medicament, chiar dacă se ştie că acest medicament ar acţiona doar la nivelul unei ţinte specifice. Metodele şi conceptele moderne care fac obiectul farmacogenomicii şi toxicogenomicii au demonstrat clar acest principiu.

Lucrarea are patru părţi: (1) Caracterizarea moleculară a interacţiunii medicament-ţintă (2) Sinteza medicamentelor pe baza enzimelor şi acizilor nucleici , (3) Metode analitice implicate implicate în producerea şi utilizarea medicamentelor şi în final, (4) Cinetică, metabolism, toxicologie şi dezvoltarea agenţilor farmacologici.

Cel dintâi capitol al primei părţi prezintă contextul biologic oferind o descriere la zi a testelor celulare care ne sunt la îndemână, aplicabilitatea şi impactul lor asupra descoperirii agenţilor farmacologici. Se analizează testele implicate în studiul proteinelor membranare, a răspunsurilor celulare rapide, testările pentru cercetarea expresiei proteice şi genice celulare , analiza spaţio-temporală şi a subpopulaţiilor celulare şi nu în ultimul rând determinarea fenotipului. În capitolul doi al primei părţi, se descriu elemente referitoare la şoareci "knock-out" (şoareci transgenici obţinuţi prin recombinare omologă, cu modificări genetice care pot conduce la eliminarea funcţiei unei gene) şi la tehnicile necesare generării unor asemenea animale.

Receptorii cuplaţi cu proteina G fac obiectul capitolelor trei şi patru. În primul dintre ele accentul este pus pe caracterizarea receptorilor cuplaţi cu proteina G şi aplicabilitatea genelor "reporter" ca sisteme de transcriere, în timp ce capitolul următor făcând referire la etapa post-genomică oferă strategii de identificare a liganzilor pentru receptorii "orfani" cuplaţi cu proteina G.

Partea a-II[a] a cărții se ocupă de diferite aspecte ale sintezei medicamentelor.Se oferă o combinație clasică între elemente de sinteză organică şi biotehnologie realizând tabloul sintezei stereoselective a medicamentelor cu ajutorul enzimelor recombinante. Prima parte a acestui capitol ne prezintă o imagine de ansamblu asupra acestor elemente şi oferă numeroase exemple evaluând rezultatele unor asemenea strategii.

În perspectivă vor fi utilizați agenți farmacologici care interacționează cu acizii nucleici . Atractivitatea lor ca şi liganzi cu specificitate mare a intrat mereu în conflict cu numeroase probleme de farmacocinetică. Cu toate acestea, numeroase concepte cu privire la stabilizarea acestor molecule, potențialul fascinant de a interacționa cu ARN-ul (RNAi) au făcut ca primele medicamente aprobate să fie extrem de similare acestor molecule, spre exemplu manipulatorii semnalizării celulare. Capitolul 6 discută mai multe aspecte, incluzând sinteza şi aplicabilitatea unor asemenea tipuri de compuşi, incluzând tehnica interacțiunii cu ARN (RNAi).

Partea a-III[a] se ocupă de aspecte analitice. Separarea enantiomerilor (enantioseparareа) medicamentelor chirale şi cromatografia de afinitate sunt instrumente importante ale dezvoltării medicamentelor şi elementele lămuritoare asupra acestor aspecte sunt prezentate în capitolele 7 şi 8.

Metode analitice bazate pe tehnici de biologie moleculară sunt incluse într-o serie de trei capitole. Două dintre acestea se axează pe descrierea tehnicilor RMN care au cunoscut o dezvoltare deosebită în ultimele decenii. Această dezvoltare a condus ulterior la definirea tehnicii RMN ca un instrument de bază în determinarea atât a structurilor macromoleculare dar şi a detectării şi caracterizării interacțiunilor dintre ligand şi molecula țintă. Capitolele 9 şi 10 analizează aplicabilitatea tehnicii RMN în descoperirea agenților farmacologici şi descrie tehnici de marcare a proteinelor cu izotopi radioactivi de C^{13} şi N^{15}.

Realizarea unor modele de structuri medicamentoase realiste are la bază cunoştințe exacte obținute prin cristalografie cu raze X. În ciuda, îmbunătățirilor evidente pe care le-a suferit metodologia în acest domeniu de cercetare, structurile receptorilor membranari, care reprezintă de fapt țintele cele mai importante ale medicamentelor, sunt încă neelucidate. Un pas uriaş către rezolvarea acestei enigme l-ar putea constitui utilizarea fragmentelor de anticorpi drept elemente de potențare ale cristalizării. Detalii despre această nouă şi captivantă tehnică sunt oferite cititorului în capitolul final al părții a-III[a] .

Farmacogenomica şi toxicogenomica sunt domenii noi cu un considerabil impact asupra viitoarei dezvoltări a agenților farmacologici. Ultima parte a cărții se ocupă de aceste subiecte noi, care vor reuşi probabil cu timpul să genereze schimbări, renunțându-se la concepțiile inițiale "aceeaşi doză este recomandată pentru toți pacienții care au aceeaşi boală". Direcțiile moderne se vor baza pe ideea "*medicamentul adecvat, doza adecvată, persoana adecvată*".

Pe de o parte, medicamentele vor acționa de manieră mai țintită şi vor antrena mai puține efecte nedorite, iar eficacitatea lor va creşte.Pe de altă parte, medicii vor fi în măsură să decidă plecând de la profilul genetic al pacientului, dacă un tratament are şanse să reuşească şi dacă nu să opteze pentru un alt tratament. Riscurile personale "ascunse" în genele unui anumit pacient vor putea fi identificate de către medic şi ținând cont de specificitatea şi individualitatea lor se va alege strategia pentru prevenție şi tratament.Totalitatea medicamentelor cunoscute sunt dirijate asupra 400 de biomolecule diferite ale organismului nostru ,molecule cunoscute sub numele de ținte terapeutice (drug targets) dintre care menționăm:enzime,receptori,şi alte biomolecule care sunt inhibate sau asupra cărora acționează într-o manieră sau alta. Datorită decriptajului genomului uman se vor descoperi între 3000 -10000 de biomolecule noi care vor fi utilzate ca situsuri de atac molecular.

Terapia genică este o cale nouă de cercetare ,care suscită un foarte mare interes. Ea îşi propune să vindece sau să atenueze efectul unei maladii "reparând" o genă defectă sau activând sute de gene utile.Strategia introduce în celulele umane(cu excepția celulelor sexuale sau gameți) o genă "corectoare" sau "terapeutică" destinată să reducă defectele genei afectate, în cazul maladiilor genetice ,sau să acționeze într-un alt mod , de exemplu să ajute sistemul imunitar să elimine cancerul.În aceste cazuri se acționează asupra genomului pentru ca organismul să producă o proteină de interes terapeutic , ceea ce presupune implicarea "ADNului ca medicament". Deşi sunt puține maladii care pot fi tratate pe baza terapiei genice această strategie ne dă numeroase speranțe, chiar dacă ea nu poate fi utilizată curent având în vedere dificultățile pe care trebuie să le depăşească.

PARTEA I: CARACTERIZAREA MOLECULARĂ A INTERACȚIUNILOR MEDICAMENT-ȚINTĂ

CAPITOLUL 1

TESTELE CELULARE: UTILIZAREA ŞI IMPACTUL LOR ÎN DESCOPERIREA MEDICAMENTELOR

1.1. Introducere

1.1.1.Testele/experimentele celulare

Experimentele bazate pe studiul celulelor permit studierea funcțiilor preparatelor farmaceutice sau a țintelor bolilor în cadrul unui mediu complex şi al contextului biologic de ansamblu. Aplicarea noilor tehnologii în biologia moleculară, împreună cu introducerea noilor metode de analiză a mutat cadrul experimentelor celulare de la nivelul fenotipic cum ar fi, proliferarea celulară, moartea celulară, respirația şi diferențierea funcțională, către analizele celulare ale funcțiilor moleculelor semnal - specifice şi ale componentelor metabolice.

În momentul de față, experimentele celulare presupun măsurători mecanice, asociate țintelor specifice, care permit identificarea componenților chimici cu funcție specifică țintei sau funcție modulatoare asociată. Se poate aşadar afirma că analizele celulare vor juca un rol din ce în ce mai important în descoperirea medicamentelor, în special a componentelor pentru validarea şi optimizarea țintei, precum şi în selecția modulatorilor cu molecule mici şi în opimizarea modulării. În contrast cu testele biochimice ale substanțelor chimice pentru modularea activității țintelor moleculare, sistemele celulare pot oferi informații adiționale cu privire la transportul, metabolismul şi stabilitatea medicamentelor. Cel mai important aspect este acela că

țintele farmacologice rămân în mediul lor natural atunci când este analizată modularea , astfel ca datele să aibă o valoare predictivă înaltă (Fig 1.1).

Cu toate acestea, mai trebuie spus că, pentru a utiliza experimentele celulare, celulele trebuie scoase din mediul lor natural şi crescute în culturi. Acest lucru va conduce inevitabil la alterări ale repertoriului genelor şi ale expresiei proteice şi deci ale fenotipului. Celulele utilizate în astfel de experimente trebuie deci să fie caracterizate din punctul de vedere al funcțiilor rețelelor intracelulare, răspunsului la stimuli externi - cel puțin pentru calea de semnalizare de interes - şi comparate cu răspunsul şi evenimentele ce au loc la nivelul țesutului sau organului. În multe cazuri, acest lucru nu este încă pe deplin realizabil.

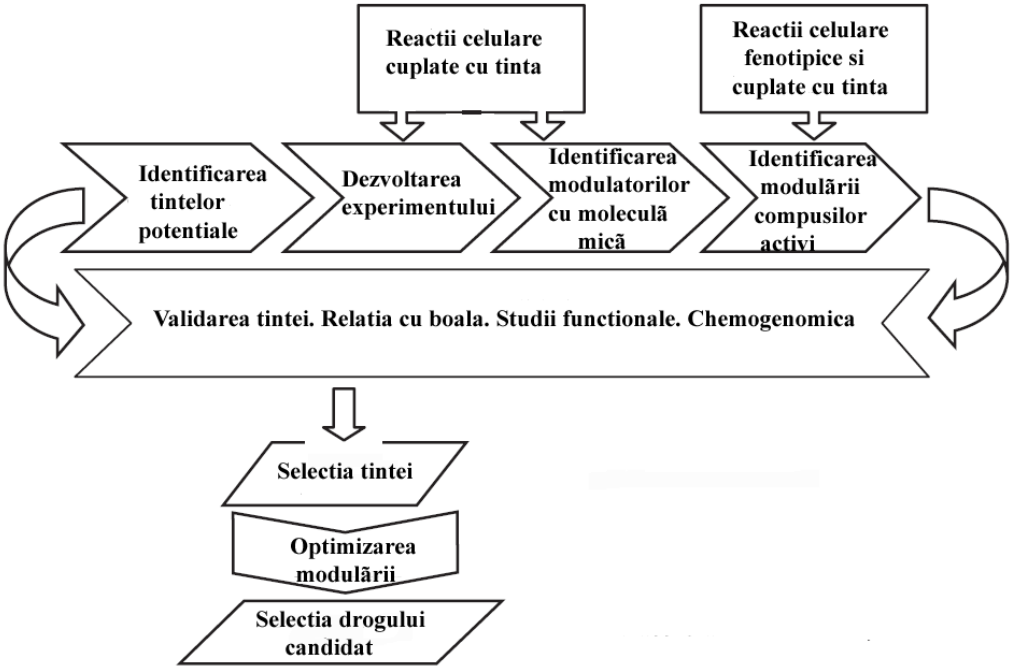


Fig. 1.1 Selecția țintelor farmaceutice. Numărul mare al țintelor farmaceutice potențiale necesită un proces eficient de selectare a acelor ținte pentru modularea căilor şi fenotipurilor relevante pentru anumite afecțiuni. Experimentele celulare, care sunt strâns legate cu țintele de interes, permit calificarea modulatorilor cu moleculă mică identificați în experimentele celulare sau biochimice de înaltă capacitate, în conformitate cu funcționalitatea într-un mediu fiziologic relevant. Experimentele celulare care nu sunt strâns legate cu ținta vor indica efectele sistemice ale componenților şi pot fi interpretate ca şi clasificare celulară "de siguranță". Testele celulare pot fi utilizate pentru prioritizarea țintelor şi a componenților.

1.1.2. Impactul asupra descoperii medicamentelor

În timpul descoperii şi dezvoltării medicamentelor, multe elemente sunt pierdute datorită efectelor nedorite sau toxicității şi lipsei eficacității dorite. O mare

parte din aceste efecte pot fi determinate de interacțiunile potențialelor medicamente cu alte ținte decât cele considerate inițial ca modulatoare ale unei afecțiuni. Sistemele de teste celulare au potențialul de a elucida multitudinea interacțiunilor medicamentoase şi deci de a contribui la o mai bună înțelegere a acțiunii şi selectării medicamentelor.

Celula, prin structura şi funcțiile sale, este organizată în cascade metabolice şi de transducție a semnalului. Majoritatea acestor cascade sunt complexe şi non-lineare [Stephaopoulos, Kelleher, 2001]. În plus, diferitele cascade comunică unele cu altele, formând circuite şi domenii intracelulare. Majoritatea bolilor nu pot fi explicate prin afectarea unei singure etape a unei căi, de semnalizare, ci prin multiple alterări care afectează rețelele într-o manieră complexă [Hanahan, Weinberg 2000, Somogyi, Greller 2001]. Similar, medicamentele, fie că interacționează specific cu o singură țintă sau cu mai multe molecule, vor perturba cascadele metabolice şi de semnalizare, într-un mod complex. În plus, din moment ce multe tipuri de celule utilizează aceleaşi molecule pentru semnalizare în contexte diferite, multe tipuri celulare pot fi afectate în grade diferite de acelaşi medicament. Introducerea recentă a evaluării expresiei genice şi proteice pe baza unor sisteme de analiză de mare capacitate, ca şi a analizelor metaboliților [Glassbrook şi colab. 2000, Raamsdonk şi colab. 2000] permit o mai bună înțelegere a gradului şi localizării interferențelor. Experimentele celulare oferă astfel o soluție pentru studierea modulării unei ținte farmacologice în rețeaua sa naturală complexă precum şi a potențialelor efecte asupra altor rețele.

Bolile umane sunt caracterizate prin una sau mai multe alterări ale căilor metabolice şi de semnalizare implicate major în menținerea homeostaziei celulare şi diferențierea funcțională. Testele celulare pot oferi o reprezentare a acestor alterări şi devin astfel modele funcționale relevante pentru evaluarea acțiunii medicamentelor.

În zilele noastre, experimentele celulare oferă oportunitatea de a identifica punctele de interferență care conduc la alterări fenotipice sau modificări finale. Frecvent, multiple nivele de intervenție sunt necesare pentru a altera efectele unor rețele biologice. Reguli similare se pot aplica pentru numărul de ținte terapeutice care trebuie modulate, în special pentru maladii complexe. Țintele potrivite şi combinațiile

medicamentoase pot fi selectate numai în cazul în care fiecare component individual al unei căi particulare poate fi studiat individual, acest lucru fiind posibil prin utilizarea sistemelor celulare.

Combinația componentelor care duc la efectul dorit poate fi identificată prin analiza mai multor parametri. Mai mult, aceste analize pot facilita aprecierea efectului componentelor individuale asupra mai multor căi. Aceasta permite o estimare a efectelor nedorite (profilul de siguranță), dar poate conduce de asemenea la identificarea unor aplicații în noile condiții. În acest fel testele realizează o selecție rapidă a componentelor chimice cu variate profile.

Ierarhic, citirea spațio-temporală va genera o bună cunoaştere a mecanismelor de acțiune a medicamentelor şi va permite prezicerea efectelor sistemice (Fig 1.2). Dezvoltarea şi aplicarea mijloacelor computerizate şi a modelelor căilor intracelulare sunt o condiție obligatorie pentru siguranța evaluării şi a interpretării [Gifford, 2002, Karp, 2001]. Înțelegerea nivelelor sistemelor este posibilă numai prin urmărirea rezultatelor experimentale la nivel celular sau sub-celular.

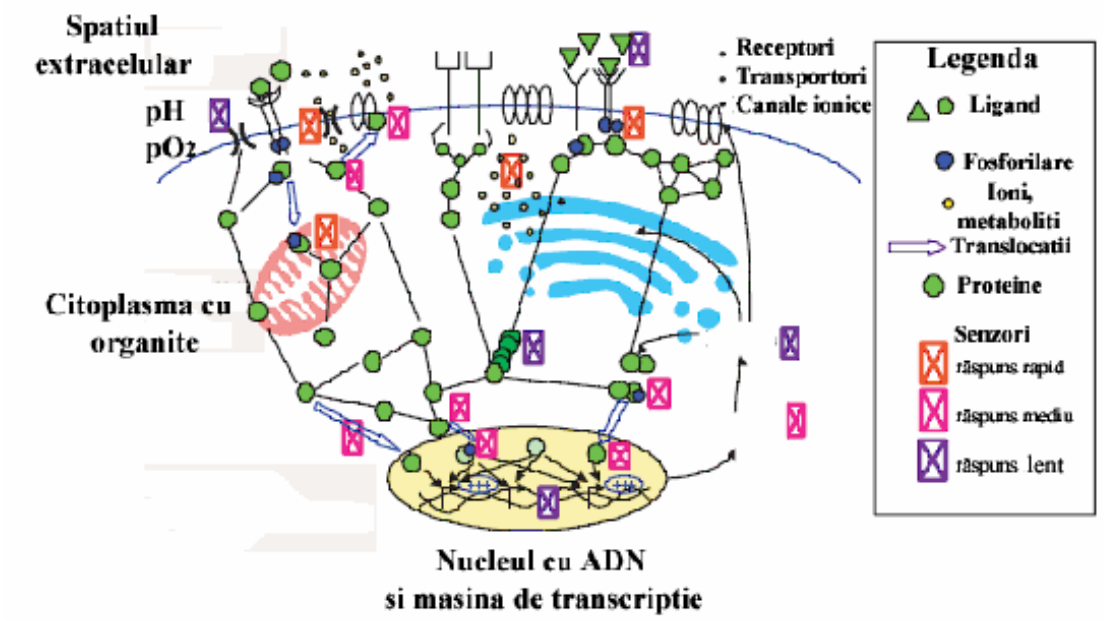


Fig. 1.2. Circuitul celular schematic şi conceptul analizei sistemelor celulare. Celulele se conectează cu mediul înconjurator printr-o varietate de receptori, canale şi transportori. Semnalizarea intracelulară ,căile şi rețelele metabolice reacționează la stimulii intra- şi extracelulari într-o manieră dependentă spațio-temporal. Diferitele tipuri de celule reacționează diferit la acelaşi stimul. Diferite tipuri de celule ale țesuturilor normale şi patologice sau celule manipulate genetic pot fi expuse la stimuli diferiți în prezența şi în absența medicamentelor şi reacțiile celulare pot fi

evaluate. Analizele multiparametrice identifică compuşii cu efecte asupra homeostaziei celulei care pot fi specifice ţintei, nelegate de ţintă, reversibile sau ireversibile.

1.1.3. Clasificarea testelor celulare

Testele celulare au avantajul că nu necesită purificarea ţintelor farmacologice. Totuşi, în multe cazuri, testele celulare necesită manipularea celulară pentru a permite citirea specifică a semnalului. Supraexprimarea receptorilor de suprafaţă celulară sau a proteinelor intracelulare pot avea efecte substanţiale asupra fiziologiei celulei şi trebuie luate în considerare atunci când se utilizează aceste teste pentru descoperirea noilor medicamente.

Reacţiile precoce ale hormonilor, factorilor de creştere şi neurotransmiţătorilor sunt deseori mediate prin intermediul mesagerilor secunzi sau influxului şi efluxului rapid de ioni. Modificările proteinelor posttranslaţionale şi translocaţia proteinelor sunt următoarele etape care alterează statusul fiziologic al unei celule. Asemenea modificări sunt capabile să conducă la modificări rapide ale căilor metabolice, precum şi la alterări ale activităţii genelor şi expresiei proteice, ducând în final la noi fenotipuri celulare, ce includ proliferarea şi moartea celulară.

Testele celulare pot fi clasificate în funcţie de evenimentele temporale care apar atunci când o celulă este expusă la alterări ale mediului extra- şi intracelular (Tabelul 1.1). Răspunsurile rapide indicatoare de modificări ale concentraţiilor ionilor sau mesagerilor secunzi conduc în final la modificari funcţionale şi fenotipice.

Unele dintre evenimentele celulare pot fi refăcute în aşa numitele sisteme model, care pot fi mai uşor de manevrat şi manipulat genetic faţă de celulele mamiferelor. Drojdiile s-au dovedit a fi organismele cel mai frecvent utizate în aceste sisteme, deoarece semnalele metabolice şi interacţiunile proteină-proteină sunt relevante pentru transducţia semnalului, putând fi traduse într-un răspuns al creşterii uşor măsurabil [White, 1996, Ito şi colab., 2001]. Câteva modificări ale dublului sistem hibrid al drojdiilor s-au dovedit utile în identificarea compuşilor care interferă funcţional cu mecanismele intracelulare specifice. Tucker şi Fields (2001*)* au descris un sistem senzor pentru descoperirea medicamentelor bazat pe activarea conformaţională, după legarea medicamentului, sau a unei enzime implicate major în

proliferare. Cu toate acestea, comparativ cu celulele mamiferelor, drojdiile prezintă unele diferențe care includ prezența peretelui celular, lipsa genelor pentru complementul total al mamiferelor şi alterări ale sistemelor metabolice.

Tabelul 1.1 Clasificarea tipurilor de reacții celulare funcționale

Mesageri secunzi şi canale	nivelele Ca^{2+} canale ionice transportori nucleotide ciclice
Dinamica proteinelor	modificari posttranslaționale (fosforilarea) translocațiile proteice
Expresia genică	tehnologiile pe chip-uri tehnologia ADN ramificat senzori oligonucleotidici
Expresia proteică	tehnologia genelor reporter reacția ELISA array-uri ale proteinelor pe chip-uri
Profilul metaboliților	profilul analitic cantitativ
Răspunsurile metabolice şi fenotipice	proliferarea celulară, citotoxicitatea, moartea celulară/ apoptoza, acidifierea diferențierea celulară

1.1.4. Progrese ale mijloacelor şi tehnologiilor pentru profilul componentelor celulare

Perfecționarea sistemelor analitice [Straub şi colab., 2001] şi a sistemelor de citire permite cercetătorilor să obțină aspecte clare ale alterărilor expresiilor genice şi proteice [Celis şi colab., 2000], precum şi a metaboliților [Glassbrook şi colab., 2000, Nicholson şi colab., 2002]. În afara situației în care este necesară o analiză pe scară largă, tehnologiile curente permit obținerea unor rezultate convenabile pentru profilul medicamentelor. Pentru studiile expresiei genice, experimentele care utilizează sonde fluorescente pot substitui sistemele ,bazate pe cipuri cel puțin pentru unele cazuri bine selecționate [Broach, Thorner, 1996; Goetz şi colab, 2000].

Actual sunt disponibile câteva sisteme de imagistică celulară sau microscopie de mare capacitate şi scanare laser, precum şi dezvoltarea unor noi markeri fluorescenți şi anticorpi specifici. Aceste combinații permit studiul traficului proteinelor în celule. Studiile dinamicii şi interacțiunii proteinelor a fost facilitat de identificarea proteinelor florescente [Raamdonk şi colab., 2000, Remington, 2002;

Schaufele, 2001] şi a altor coloranţi fluorescenţi [Mitchell, 2001], împreună cu aplicaţiile fluorescenţei cu transfer de energie prin rezonanţă (fluorescence resonance energy transfer - FRET). Alte tehnologii, precum spectroscopia cuplată multipolară (multipole coupling spectroscopy - MCS) [Hefti, Kumar, 1999] şi biochip-urile pentru monitorizarea celulară multiparametrică [Baumann, 1999] sunt pe cale de a fi utilizabile.

Sistemul FLIPR^{TM} (Cititorul de plăci fluorometrice; Molecular Devices, Sunnyvale, CA) utilizat pentru studiul răspunsurilor rapide ale mesagerilor secundari, precum eliberarea Ca^{2+}, a fost recent îmbunătăţit pentru a permite analiza canalelor ionice. Aplicaţiile FLIPR sunt discutate în detaliu mai jos.

În secţiunile următoare, vom descrie în detaliu un set selectat de aplicaţii. Discuţiile sunt grupate, pe baza tabelului 1.1, în răspunsuri rapide sau sistemele mesagerilor secundari, alterări ale expresiei genice sau proteice, alterări metabolice, precum şi efectele asupra fenotipului [Dingerman şi colab.,2004].

1.2. Proteinele membranare şi răspunsurile celulare rapide

O varietate de proteine membranare au fost exprimate în diferite celule eucariote (linii celulare ale mamiferelor, celule ale insectelor, drojdii) cu ajutorul tehnologiei ADN recombinant, pentru a studia receptorii de suprafaţă celulară, canalele ionice sau proteinele de transport.

1.2.1 Receptorii

Receptorii de suprafaţă celulară mediază semnalizarea celulară de la suprafaţa celulară la citoplasmă şi/sau nucleu prin intermediul a două procese majore, semnalizarea prin intermediul receptorilor legaţi la enzime sau a proteinelor de legare a GTP (proteinele G). Receptorii legaţi la enzime includ receptorii guanilat ciclazici, receptorii tirozin-kinazici, receptorii asociaţi tirozin kinazei, receptorii tirozin fosfatazici şi receptorii serin/treonin kinazici [Schlessinger, 1993]. În toate cazurile, în urma activării este iniţiată o cascadă de evenimente care afectează statusul receptorilor şi concentraţia uneia sau mai multor molecule mici de semnalizare

intracelulare. În cele ce urmează, vom discuta monitorizarea semnalelor mediate de proteinele G, care sunt activate de receptorii cuplați cu proteina G în urma legării unui ligand specific. Consecutiv stimularii au loc modificari ale AMPc intracelular sau concentrației Ca^{2+}. Aceste două molecule semnal specifice sunt implicate în procesele reglatoare ale sistemelor cardiovascular şi nervos, mecanismelor imune, diferențierii şi creşterii celulare şi metabolismului. Ambii mesageri acționează ca efectori alosterici pe proteine țintă specifice ale celulei, incluzând kinazele (protein kinaza A şi C), lipazele (fosfolipaza Cβ), proteinele de legare a Ca^{2+} (calmodulina) şi canale ionice (receptori glutamat ionotropici). Concentrațiile citoplasmatice ale mesagerilor secundari sunt reglate prin intermediul enzimelor membranei plasmatice – în cazul căii AMPc enzima adenilat ciclaza produce direct AMPc, iar în cazul căii Ca^{2+} lipazele sunt stimulate să producă mesagerul solubil inozitol trifosfatul (IP3) care induce eliberarea Ca^{2+} din reticulul endoplasmic. În unele cazuri canalele ionice sunt activate prin interacțiunea directă cu subunitățile proteinei G [Cruce M, 2000].

În prezent au fost realizate diferite tehnologii pentru monitorizarea intracelulară a mesagerilor secundari în celule. Detectarea Ca^{2+} este în general bazată pe indicatorii fluorescenți, care au proprietatea de a penetra cu uşurință membranele celulare şi a-şi altera emisia fluorescentă în urma legării Ca^{2+}. Pentru măsurătorile unui răspuns rapid şi tranzitor, reacția de legare a Ca^{2+} trebuie să fie reversibilă, oferind date cinetice importante care permit diferențierea unui semnal tranzitor tipic datorat activării specifice a receptorului de un semnal nespecific care afectează homeostazia Ca^{2+} şi permeabilitatea membranară.

În mod curent se utilizează numeroase sisteme, diferite, pentru a detecta AMPc în testele celulare. În cele mai multe cazuri celulele sunt lizate în urma expunerii la un ligand specific, iar cantitatea de AMPc este determinată printr-o imunoreacție competitivă (Perkinelmer Life Sciences, Boston, Ma; Molecular Devices; Biomol Research Laboratories, Plymouth Meeting, Ca) sau printr-o reacție enzimatică competitivă de complementare (Discoverx, Fremont, Ca).

Tipic, receptorii cuplați cu proteina G sunt supraexprimați în liniile celulelor eucariote pentru a monitoriza concentrația mesagerilor secundari în urma stimulării

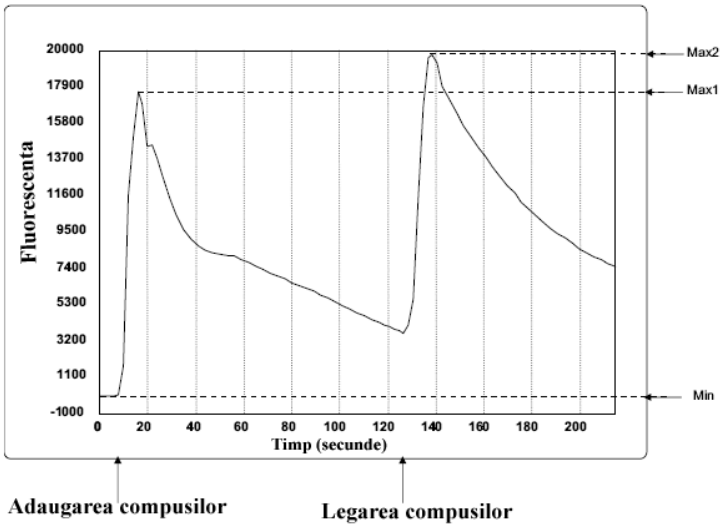
cu un ligand specific [Sullivan şi colab., 1999]. În multe cazuri, co-exprimarea unei subunități corespunzătoare sau a proteinelor G himerice este necesară pentru a obține un semnal suficient pentru detecție [Milligan, Rees, 1999].

1.2.1.1 Tehnologia FLIPR pentru detecția eliberării Ca^{2+} intracelular

Sistemul FLIPR permite „citiri" repetate pentru sistemele de analiză de mare capacitate în reacțiile celulare. Pe scurt, celulele sunt încărcate cu un indicator fluorescent (ex. Fluo-4 AM pentru Ca^{2+}) care arată un spectru de absorbție compatibil cu o excitație la 488 nm de la o sursă laser argon mergând până la o emisie maximă la 516 nm în prezența Ca^{2+}. Emisia fluorescentă este indusă simultan în toate situsurile unei plăci cu 96 sau 384 de situsuri, iar cinetica eliberării Ca^{2+} intracelular, declanşată de expunerea la un ligand specific, poate fi monitorizată la o rată de maxim 60 de ori pe minut. Sistemul FLIPR distinge rapid agoniştii compleți, agoniştii parțiali şi antagoniştii pentru a accelera screening-ul primar şi secundar.

Figura 1.3(a) ilustrează un experiment tipic efectuat pe o linie de celulară de mamifer transfectată cu un vector ce conține gena GPCR. Componentele pozitive reprezentate în figura 1.3(b) au fost verificate prin măsurători în duplicat, iar modulatorii cu moleculă mică au fost ulterior testați pentru relația doză-răspuns prin experimente EC50/IC50.

(a)



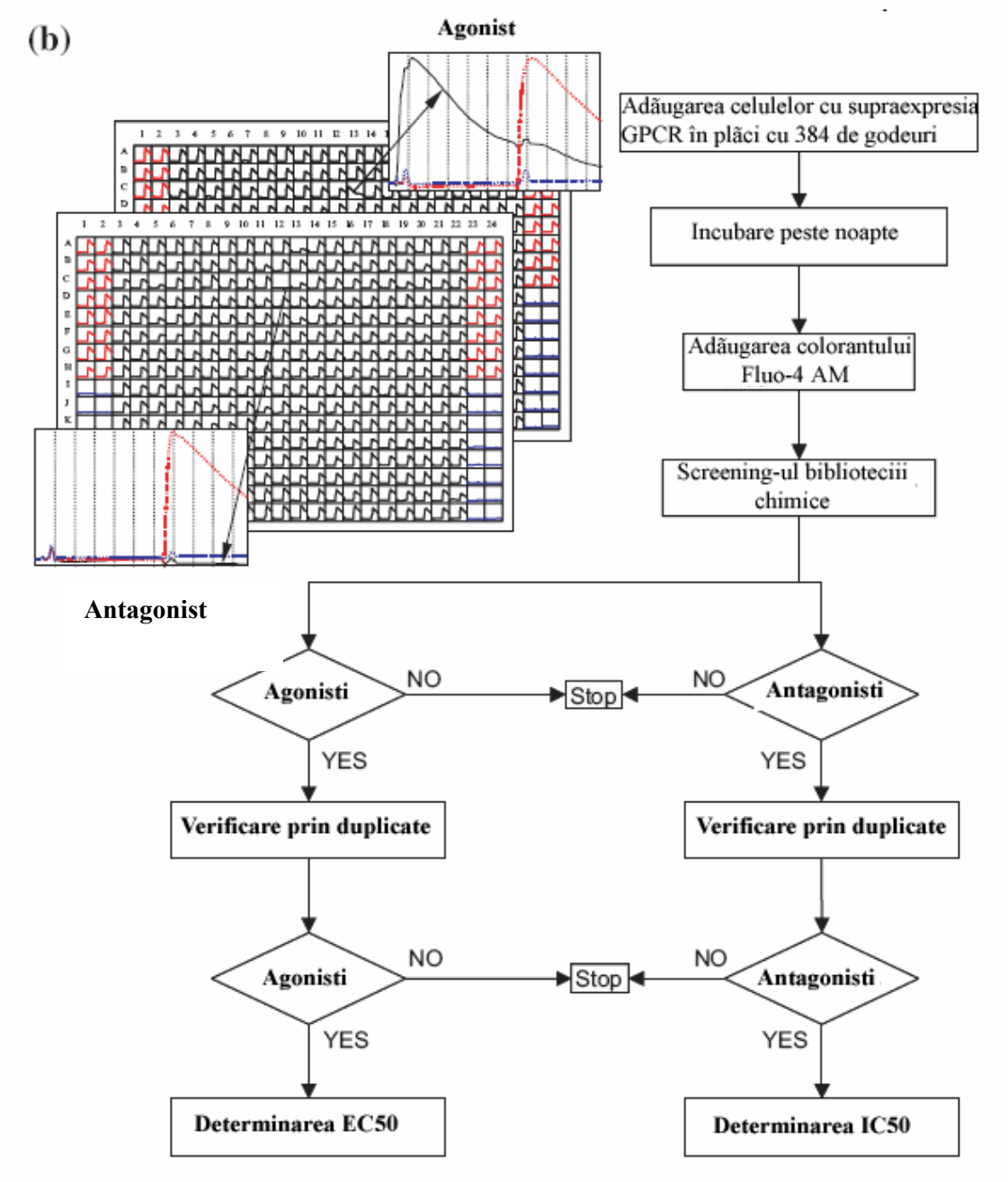


Fig 1.3. Determinarea Ca^{2+} intracelular prin sistemul FLIPR.

Fig 1.3.(a) Curbă a cineticii Ca^{2+} tipice, precum şi parametrii utilizaţi pentru calcularea semnalului fluorescent maxim. În acest exemplu maximele au fost măsurate înainte şi după adiţia ligandului (Max 1 si Max 2) şi au fost standardizate prin diviziune la minima masurată înainte de adăugarea compusului (Min). Media controalelor pozitive a fost stabilită control 100%, iar media controalelor negative a fost stabilită control 0%. Pentru fiecare godeu, au fost calculate activităţile relative în funcţie de controale.

Fig 1.3 (b) Diagramă a fluxului pentru un experiment tipic. Celulele modificate genetic care au ţinta GPCR supraexprimată au fost adăugate în plăci cu 384 de godeuri peste noapte. Celulele au fost spălate cu soluţie tampon înainte de adaugarea soluţiei tampon ce conţinea colorantul Fluo-4 AM, urmată de o incubare de 45 de minute. După o etapă adiţională de spălare, plăcile au fost transferate în aparatul FLIPR şi au fost adăugaţi compuşii chimici, urmaţi de adiţia ligandului. Emisia fluorescenţei a fost monitorizată începând de la un moment anterior adiţiei compusului şi continuată până când s-a observat o descompunere substanţială a semnalului. În graficele mărite sunt prezentate exemple de agonist şi antagonist.

1.2.1.2. Tehnica reacțiilor competitive în detecția AMPc intracelular

Cele mai multe experimente utilizate pentru detecția AMPc intracelular sunt bazate pe anticorpi monoclonali care recunosc specific AMPc. Clasic, lizatele celulare sunt amestecate cu AMPc biotinilat exogen pentru a forma un heterotrimer cu un anticorp specific şi streptavidina. Formarea acestui complex este în competiție cu AMPc endogen nebiotinilat. Streptavidina şi anticorpii se pot lega covalent la un fluorofor donor şi acceptor (criptat de europiu şi aloficocianina), formând o pereche FRET interactivă după formarea complexului. Un semnal scăzut este observat atunci când este crescută producția de AMPc intracelular, datorită competiției pentru legarea la anticorpul specific.

Tehnologia AlphaScreen^{TM} (PerkinElmer Life Sciences) este o tehnologie alternativă care permite detecția cantitativă a unei game variate de componente celulare, inclusiv AMPc. AlphaScreen are la bază utilizarea unor particule „donor” şi „acceptor” care sunt acoperite cu un strat de hidrogel care oferă grupări funcționale pentru bioconjugare. Când particulele sunt aduse una lângă alta, este inițiată o cascadă de reacții chimice pentru a produce un semnal înalt amplificat. Înainte de excitarea laser, un fotosensibilizator din particula „donoare” converteşte oxigenul ambiental la starea excitată de singlet. Moleculele de oxigen în starea de singlet difuzează pentru a reacționa cu chemiluminiscentul de la nivelul particulei „acceptoare”, ceea ce activează fluoroforii conținuți în aceeaşi particulă. AlphaScreen a fost utilizat în testele funcționale ale GPCR pentru detecția producției endogene de AMPc.

În toate sistemele menționate mai sus, celulele sunt supuse lizei înainte de realizarea măsurătorilor, adăugând nu numai un pas suplimentar procedurii, dar, mai important, făcând imposibile măsurătorile cinetice deoarece datele pot fi obținute numai la final. În plus, au fost dezvoltate metode FRET care au la bază studiul celulei ca întreg pentru studiul dinamicii temporale şi spațiale a nucleotidelor ciclice (vezi 1.4.4).

1.2.1.3. Tehnologia Complementării Fragmentelor Enzimatice (EFC)

EFC are la bază organisme modificate genetic ce conțin două fragmente legate de o reacție enzimatică, de exemplu acceptorul enzimei (EA) şi donorul enzimei (ED). Fragmentele separate sunt inactive şi numai formarea spontană de heterodimeri duce la forma enzimatică activă [Zabin, 1982]. Tehnologia HitHunter^{TM} (DiscoveRx) este bazată pe o variantă modificată a enzimei β-galactozidaza care formează perechea EA/ED. Această tehnologie a fost adaptată pentru utilizarea în multe reacții în care sunt implicate: kinaza, receptorul progesteronic, receptorul estrogenic şi AMPc. În acest capitol vom discuta numai despre aplicația specifică pentru detecția intracelulară a AMPc. Pe scurt, este utilizat un conjugat peptidic ED-AMPc din care AMPc este recunoscut de un anticorp specific. În absența anticorpului specific, fragmentul ED este capabil să complementeze EA pentru a forma un complex activ. În această reacție, anticorpul AMPc este titrat pentru inhibiția completă a formării enzimei. Expunerea lizatului celular la o anumită cantitate de anticorp permite formarea complexului anticorp-AMPc, reducând astfel cantitatea liberă de anticorp. Ca urmare, adăugarea de conjugat ED în urmatoarea etapă a reacției va conduce la scăderea formării complexului anticorp-ED, promovând astfel complementarea enzimei active. ED-conjugat liber din reacție este proporțional cu concentrația AMPc intracelular, acelaşi principiu putând fi aplicat pentru măsurarea activității β-galactozidazei.

1.2.2. Proteine de transport membranar

O mare varietate de substanțe sunt transportate în interiorul organismelor complexe, în unele cazuri prin intermediul transportului pasiv, prin difuziune facilitată datorată gradientului de concentrație scăzut, sau prin intermediul căilor paracelulare sau transcelulare. Absorbția şi distribuția multor constituenți alimentari precum ionii, monozaharidele, aminoacizii şi nucleotidele sunt mediate/facilitate de proteine specifice de transport membranar, care formează canale prin membranele celulare. Mecanisme similare sunt necesare pentru îndepărtarea activă a xenobioticelor, produşilor de metabolism din țesuturi. Aceste proteine specifice de

transport „carrier” sunt divizate în două clase, transportori uniport (sisteme uniport), respectiv transportori cuplați (sisteme de transport cuplat), primii transportând un singur tip de moleculă de pe o față pe alta a membranei, iar transportorii cuplați transferă o moleculă în funcție de transportul simultan sau secvențial al celei de-a doua [Ardelean, Tripşa, 2001].

Sistemele de transport cuplat sunt la rândul lor divizate în transportori simport, care transportă simultan moleculele în aceeaşi direcție şi transportori antiport, care transportă moleculele în direcții opuse. Unii transportori specifici acționează într-o manieră pasivă, transferând moleculele în funcție de gradientul de concentrație; acesta este cazul multor nutrienți precum glucoza, găsită în concentrații mari în spațiul extracelular. O situație similară este reprezentată de canalele ionice cu poartă comandată de ligand sau de voltaj din sistemul nervos, care eliberează ionii după stimularea de către neurotransmițători, respectiv depolarizarea membranară. În schimb, transportorii activi sunt dependenți de hidroliza ATP-ului şi ei transferă moleculele împotriva gradientului de concentrație.

Cel mai bine cunoscut şi variat grup de proteine de transport activ îl constituie super-familia de transportori ABC (casetă legată la ATP) [Dean şi colab., 2001]. Au fost descrise peste 50 de transportori ABC, substraturile transportate fiind foarte variate: aminoacizi, monozaharide, ioni anorganici, polizaharide, peptide şi chiar proteine mari. Unul dintre cei mai studiați transportori ABC, proteina de rezistență la mai multe medicamente - MDR1 (multi-drug resistance) [Brinkmann, Eichelbaum, 2001], a fost în centrul atenției multor eforturi de descoperire a medicamentelor în ultimii ani deoarece supraexpresia acestei proteine în celulele canceroase umane poate determina rezistența simultană a acestor celule la o varietate de chimioterapice din clase diferite.

Alte procese importante în care se implică transportorii ABC includ rezistența la clorochină în malarie, prezentarea peptidelor antigenice celulelor imune în maladia genetică fibroza chistică [Hwang şi colab., 2001].

1.2.2.1. Canalele ionice

Majoritatea celulelor mențin un potențial electric de o parte şi de alta a membranei,care este cel mai bine studiat la nivelul neuronilor şi celulelor musculare al căror potențial atinge o valoare înaltă de aproximativ -70mV. Potențialul membranar este menținut de pompa de sodiu şi potasiu (Na^+, K^+ - ATPaza) care funcționează ca o pompă antiport de transport activ ce scoate din celula 3 ioni de Na^+ şi introduce 2 ioni de K^+ pentru fiecare molecula de ATP hidrolizat, creând astfel o încărcătură negativă în interiorul celulei [Ardelean, Tripşa, 2001].

Proteinele canal formează pori hidrofili care traversează bistratul lipidic, permițând anumitor ioni să treacă de pe o parte pe cealaltă a membranei datorită gradientului de concentrație. O caracteristică a canalelor ionice este prezența unui mecanism cu „poartă" care controlează mişcarea ionilor. În acest capitol vom insista asupra canalelor ionice exprimate în neuroni şi celulele musculare, care au astfel un rol important în semnalizarea neuronală şi contracția musculară. Schimbările potențialului membranar pot fi induse într-o manieră limitată spațial, prin intermediul canalelor de Na^+ cu poartă comandate de ligand – în acest caz neurotransmițătorul. Deschiderea ulterioară a canalelor de Na^+ comandate de voltaj induce auto-propagarea depolarizării de-a lungul membranei celulare (potențialul de acțiune), inducând în final deschiderea canalelor de Ca^{2+} cu poartă comandate de voltaj de la nivelul sinapsei. Influxul de Ca^{2+} induce eliberarea neurotransmițătorilor în fanta sinaptică, propagând semnalul în celula post-sinaptică. Funcționarea deficitară a canalelor ionice stă la baza multor afecțiuni incluzând afecțiuni musculare şi cardiace, epilepsia, migrena, depresia şi ataxia.

Deschiderea canalelor ionice este în cele mai multe cazuri monitorizată prin măsurarea modificărilor potențialului membranar. Standardul de aur utilizat în acest scop este tehnologia *patch clamp*, care oferă o sensibilitate foarte înaltă, rezoluție temporală bună, precum şi măsurarea conductanței unui singur canal la un voltaj precis. Această tehnologie oferă cele mai bune informații pentru evaluarea funcțională a canalelor ionice; dezavantajele majore ale acestei tehnici includ participarea operatorilor experimentați, experimente laborioase şi rezultate puține. În

prezent, diferite companii sunt implicate în dezvoltarea noilor echipamente pentru automatizarea procedurilor patch-clamp. Unul dintre cele mai avansate echipamente este stația IonWorks^{TM} (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) care utilizează tehnicile de fluidică integrată pentru poziționarea automată a unei singure celule în godeurile unui suport special. Înregistrări ale unui singur canal ionic au fost obținute la o rată de până la 2000 de reacții pe zi. Rezultate mai bune sunt obținute prin utilizarea coloranților solvatocromatici pentru care celulele sunt permeabile, precum DiBAC (Molecular Probes, Eugene, OR) sau prin utilizarea colorantului recent descoperit FMP (Molecular Devices). Asocierea cu sistemul FLIPR permite monitorizarea funcției canalelor ionice prin sisteme de analiză de mare capacitate, depăşind numărul de 30000 de compuşi analizați pe zi. Detalii cu privire la alte tehnologii de analiză a canalelor ionice au fost descrise de Xu şi colab., (2001).

Tehnologia FLIPR şi analiza canalelor ionice. Pentru identificarea compuşilor care modulează activitatea canalelor ionice este imperativă disponibilitatea evaluărilor rapide şi economice ale activităților biologice prin analize de mare capacitate. Una din metodele bazate pe fluorescență care testează modificările potențialului membranar utilizează o sondă fluorescentă potențiometrica – acid bis-(1,3-dibutilbarbituric) trimetin oxonol [DiBAC4(3)], care separă compartimentele intracelulare şi extracelulare în funcție de potențialul electric de o parte şi de alta a membranei. În urma depolarizării celulei, colorantul pătrunde în celulă, iar legarea la situsurile hidrofobe intracelulare se traduce într-o creştere a intensității semnalului fluorescent. Invers, hiperpolarizarea membranei declanşează eliminarea colorantului din celulă şi scăderea fluorescenței deoarece cuantumul producției DiBAC4(3) este scăzut în mediu apos. Deoarece separarea DiBAC4(3) este un proces lent, aceasta tehnologie nu este aplicabilă pentru evaluarea canalelor cu o cinetică rapidă la nivelul porții sau cu desensibilizare rapidă. Îmbunătățiri substanțiale au fost obtinuțe odată cu descoperirea colorantului FMP [Baxter şi colab., 2002] care are o cinetică de separare mai rapidă. Figura 1.4 prezintă un experiment tipic condus cu miotuburi diferențiate (linia celulară C2C12).

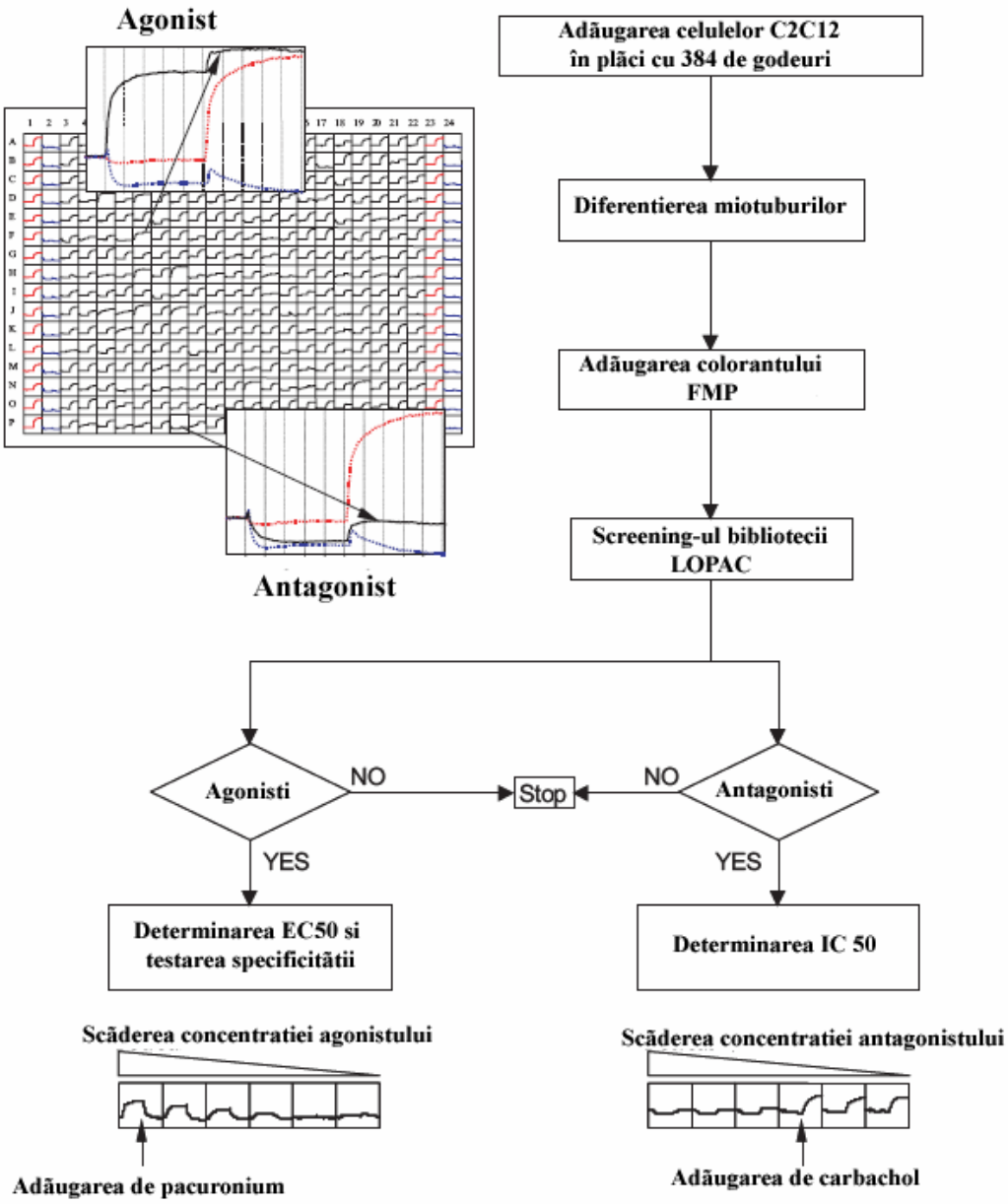


Fig 1.4 Activitatea canalelor ionice în miotuburi diferențiate. Linia celulară de celule musculare murine C2C12 a fost utilizată pentru validarea colorantului FMP. Celulele C2C12 au fost adăugate în plăci şi diferențiate în miotuburi prin expunerea la ser de cal. Celulele C2C12 diferențiate exprimă nAchR, iar depolarizarea celulelor poate fi indusă cu un agonist specific pentru receptor, precum carbacol. Exemple de agonist şi antagonist sunt reprezentate în graficele mărite.

Biblioteca LOPAC (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) a compuşilor farmacologici activi a fost supusă screening-ului pentru identificarea compuşilor care exercită efecte agoniste sau antagoniste asupra receptorului nicotinic al acetilcolinei (nAChR). Pe scurt, celulele au fost spălate cu o soluție tampon şi încărcate cu colorant FMP timp de 30 de minute la temperatura camerei. 644 de compuşi din libraria LOPAC au fost adaugați în FLIPR, urmați de stimularea cu carbacol.

În contrast cu semnalizarea tipică prin intermediul Ca^{2+}, depolarizarea membranară nu prezintă o cinetică tranzitorie. Evaluarea datelor şi identificarea modulatorilor poate fi efectuată după modelul descris în figura 1.3. Identificarea agoniştilor şi antagoniştilor este posibilă într-un singur experiment. Compuşii pozitivi au fost supuşi determinării EC50/IC50 şi, în cazul agoniştilor, antagonistul specific al AChR - pancuronium a fost utilizat pentru a evidenția reversul semnalului carbacol (vezi Fig. 1.4). Inițial, 21 de compuşi au fost identificați ca agonişti, iar 12 compuşi au avut specificitate pentru AChR.

Tehnologia VIPR™ (Voltage Ion Probe Reader) şi analiza canalelor ionice Tehnologia VIPR **(**electrod folosit la măsurători de potențial între mediul intern şi extern al unei celule) (Aurora Bioscience, San Diego, CA) este bazată pe FRET şi utilizează două molecule fluorescente. Prima moleculă, oxonol este un ion hidrofob, înalt fluorescent, încărcat negativ, care poate fi rapid redistribuit între două situsuri de legatură pe cele două fețe ale membranei plasmatice ca răspuns la modificările potențialului membranar. Cea de-a doua moleculă fluorescentă, lipidul coumarina se leagă specific pe o față a membranei plasmatice şi funcționează că un donor FRET pentru molecula acceptoare de oxonol sensibil la voltaj. Când molecula de oxonol ajunge la nivelul situsului intracelular al membranei plasmatice în urma depolarizării, FRET este scăzut, ceea ce se traduce în creşterea fluorescenței donorului şi descreşterea emisiei oxonolului. Această tehnologie permite dezvoltatea cercetărilor în domeniul biologiei canalelor ionice. Tehnologia VIPR poate furniza cadre de citire subsecvențe real-time în urma reacțiilor efectuate în microplăci.

1.2.2.2. Proteinele MDR

MDR (proteina rezistentă la medicamente) este în principal legată de supraexpresia proteinelor superfamiliei de transportori ABC. Cel mai studiat membru al acestei superfamilii este produsul genei MDR1 (glicoproteina P) care este exprimată în intestin, rinichi, ficat, bariera hemato-encefalică şi în multe celule tumorale. În ultimul caz, supraexpresia genei MDR1 este unul din factorii principali ai rezistenței celulelor la chimioterapia cancerului. Această rezistență este rezultatul

pompării medicamentelor anticanceroase în exteriorul celulelor, rezultând scăderea nivelelor intracelulare ale acestora. Moleculele mici, capabile să reversibilizeze efluxul pot restaura sensibilitatea la medicamente a celulelor tumorale rezistente. Cele mai utilizate metode pentru identificarea inhibitorilor pompei MDR sunt bazate pe substraturile fluorescente ale glicoproteinei P, precum Hoechst 33342, rodamina 123 şi rodamina 6G. Celulele sunt încărcate cu substratul, iar colorantul extracelular este îndepărtat prin spălarea cu detergenți anterior lizei [Sarver şi colab., 2002]. Măsurătorile emisiei fluorescenței oferă rezultate cantitative, proporționale cu acumularea intracelulară a substratului. Expunerea celulelor la inhibitorii pompei MDR va reduce efluxul substratului şi deci va determina înregistrarea unui semnal fluorescent crescut. Aceste reacții nu sunt omogene şi implică etape de spălare după încărcarea celulelor cu colorantul corespunzator. Un nou substrat pentru pompa MDR a fost dezvoltat recent pentru realizarea unor reacții omogene într-un sistem FLIPR.

Tehnica FLIPR pentru Multirezistența la Medicamente (FLIPR Multidrug Resistance Assay) (Molecular Devices) este o aplicație omogenă care necesită numai 15 minute de incubare la temperatura camerei cu un colorant proprietar, care este transportat de către produsul genei MDR1 şi el îşi modifică proprietățile fluorescente numai în urma acțiunii enzimelor intracelulare asupra sa. Aceasta permite performanța reacțiilor cinetice asupra celulelor vii pentru screening-ul inhibitorilor pompei MDR. Eliminarea etapelor de spălare şi controlul temperaturii a determinat automatizarea reacției [Sarver şi colab., 2002].

1.3. Evaluarea expresiei genelor şi proteinelor în cadrul unor sisteme de analiză de mare capacitate

Profilul expresiei genelor şi proteinelor poate fi aplicat în descoperirea medicamentelor cu cel puțin două scopuri diferite.

Prima aplicație este pentru descoperirea noilor medicamente potențiale. În acest caz, ținta de interes o constituie fie o componentă a sistemului de expresie, fie monitorizarea expresiei ca indicator pentru ținta din amonte ce reflectă răspunsul celular cuplat [Broach, Thorner, 1996].

Pentru a face un screening de mare capacitate (HTS) posibil, secvențele promotoare de interes, care sunt cuplate cu evenimentele celulare din amonte, sunt legate la aşa-numitele gene reporter, care servesc ca indicatori pentru activarea transcripției şi translației.

Cea de-a doua aplicație este utilizarea profilului expresiei pentru a obține informații asupra specificității la nivel celular a unui medicament candidat sau pentru identificarea unor markeri surogat pentru acțiunea medicamentelor. În acest caz, ar trebui investigată expresia genică sau proteică a cât mai multor gene sau proteine ca răspuns la un potențial medicament candidat. Modelele de expresie pot fi utilizate ca un indicator pentru numărul interacțiunilor dintr-o celulă. Asemenea date pot fi relevante pentru înțelegerea impactului modulării unei singure ținte terapeutice asupra întregului sistem celular. Chip-uri de expresie genică au fost introduse recent pentru măsurarea simultană a sute de gene exprimate la nivelul ARNm [Epstein, Butow, 2000]. Utilitatea acestei abordări, a fost recent validată la drojdii; în acest caz profilurile expresiilor au identificat căi ale unor mutații necaracterizate anterior sau au identificat noi potențiale ținte terapeutice. Similar, au fost introduse chip-uri pentru caracterizarea expresiei proteice pentru a captura o fracțiune particulară a proteinelor şi a permite analiza cu o cantitate rezonabilă de probă [Weinberger şi colab, 2002]. În plus, tehnicile de proteomică au fost introduse de Celis şi colab., (2000).

Analiza a mii de probe devine o condiție obligatorie dacă profilurile de expresie sunt utilizate în identificarea unui modulator. Selecția modulatorilor cu molecule mici şi optimizarea modulării vor necesita analize de mare capacitate care să fie la nivelul a sute sau mii de componente. Ambele pot fi obținute prin focalizarea asupra unor gene indicatoare selectate sau a produşilor lor, indicatori mai degrabă ai țintei de interes decât ai profilului complet al expresiei.

În secțiunea următoare ne vom axa pe exemple care pot fi aplicate în descoperirea inițială a medicamentelor. Chip-urile pentru expresia genică [Epstein, Butow, 2000; Weinberger şi colab, 2002] şi tehnologiile de proteomică sunt subiectul multor recenzii recente.

1.3.1. Analiza genelor reporter pentru identificarea modulării compuşilor biologici activi

Factorii de transcripție pot fi clasificați atât în funcție de natura structurală, cât şi în funcție de modul în care răspund pentru modularea transducției semnalului. O astfel de clasificare, esențială pentru tehnologiile ce implică genele reporter, aparține lui Brivanlou şi Darnell (2002). Conform acestei clasificări, factorii de transcripție pot fi grupați în două mari clase – aceia care sunt activați constituțional şi cei a căror activitate este reglată într-o manieră spațio-temporală, cantitativă şi calitativă. Din clasa factorilor de transcripție reglați face parte clasa factorilor de transcripție dependenți de semnal, care sunt activați în urma unui semnal intracelular sau extracelular. Genele reglate prin intermediul acestor factori de transcripție dependenți de semnal sunt atractive ca gene reporter deoarece cuplează căile de semnalizare cu răspunsul transcripțional.

Semnalele extracelulare, în urma interacțiunii cu moleculele receptoare corespunzătoare de pe suprafața celulei, inițiază o cascadă de evenimente intracelulare care conduc la alterări ale expresiei unui set de gene. Una sau câteva dintre aceste gene pot fi utilizate ca indicatori pentru modularea țintelor în cadrul unor căi de semnalizare specifice. Activarea unei anumite gene poate fi uşor identificată prin „ataşarea” la gena de interes a unei aşa-numite gene reporter. Pentru acest scop, trebuie create plasmide care conțin promotorul sau regiunea reglatoare a genei de interes lângă gena reporter. Aceste plasmide sunt apoi introduse într-o linie celulară care exprimă calea de interes ce conține țintele farmacologice şi cuplează indicatorul reporter cu calea particulară de interes. Un număr de gene au fost descrise ca fiind gene reporter [Broach, Thorner, 1996]. Expresia poate fi monitorizată prin intermediul fluorescenței, de exemplu prin utilizarea unei proteine fluorescente verzi (GFP) ca reporter sau prin detecția cu anticorpi marcați fluorescent. Alternativ, este utilizată activitatea enzimatică a reporterului, aşa cum se întâmplă în cazul luciferazei care converteşte substratul într-un produs luminescent, sau reporterul este detectat cu ajutorul fluorescenței, luminescenței sau reacțiilor colorate ale produşilor secundari.

Tehnologia ce implică utilizarea genelor reporter a fost utilizată pe scară largă pentru a realiza HTS pentru o varietate de ținte de interes în descoperirea medicamentelor. Pentru multe ținte, precum receptorii transmembranari pentru care alte metode de screening erau dificil de realizat, tehnologia genelor reporter a devenit metoda cea mai bună pentru identificarea modulării compuşilor biologici/ farmacocinetici activi (*lead finding*). Exemplele selectate includ utilizarea reacțiilor ce implică genele reporter în identificarea agoniştilor şi antagoniştilor pentru o mare varietate de GPCR [Goetz şi colab., 2000] transfectați într-o linie de celule ovariene de hamster (CHO) cu un construct al reporterului luciferazei 6xCRE. Această linie celulară a servit ca un indicator pentru GPCR, precum receptorul pentru melanocortina-1 care în urma stimulării modulează nivelele de AMPc în celulă. Aceasta reacție poate fi realizată într-o placă cu 384 godeuri, oferind astfel economii substanțiale de timp, cost şi realizare a culturilor celulare. În aceeaşi linie celulară a fost stabilit un sistem HTS pentru receptorul metabotropic al glutamatului mGluR7. Receptorul mGluR7 este cuplat negativ cu adenilat/adenilil ciclaza şi stimularea sa duce la scăderea nivelelor de AMPc. Celulele CHO au fost transfectate stabil cu ADNc pentru mGluR7 de la şobolan şi o genă reporter care răspunde la AMPc. Aplicabilitatea pentru HTS a fost demonstrată într-o linie în care nivelele de AMPc induse de forskolina (un activator al adenilat ciclazei) au fost reduse semnificativ de către agoniştii receptorilor. Xing şi colab. (2000) au descris o metodă directă pentru investigarea receptorilor cuplați negativ cu adenilat ciclaza. Linia celulară CHO transfectată stabil a conținut trei plasmide distincte: (i) o proteina himerică $G_{q/i}$ – care redirecționează semnalul G_i negativ într-un semnal G_q pozitiv; (ii) un GPCR cuplat cu G_i, în acest caz receptorul μ-opioid sau receptorul pentru 5-hidroxitriptamina şi, (iii) reporterul 3xNFAT β-lactamazei. Astfel, activarea GPCR cuplat cu G_i s-a translatat într-o activare NFAT prin intermediul căii de semnalizare mediata de G_q, permițând monitorizarea expresiei β-lactamazei într-un format HTS.

O mare varietate de linii celulare diferite au fost utilizate pentru a stabili reacțiile genelor reporter. Celule din rinichiul embrionar uman (HEK) 293-EBNA crescute în culturi celulare în suspensie au fost utilizate pentru expresia receptorilor

prostanoizi cuplați cu un reporter CRE-SEAP (fosfataza alcalină secretată de placenta umană). Celulele ECV304, o linie celulară transformată spontan, derivată din celule endoteliale ale venei ombilicale umane, au fost transfectate cu un reporter ICAM-1 pentru screening-ul componenților care inhibă expresia ICAM-1 în urma stimulării cu interleukina IL-1b. Linia celulară provenită din celule de cancer mamar uman MDA-MB-453 a fost utilizată ca gazdă a transfecției pentru a stabili reporterii stabili sub controlul promotorului virusului tumorii mamare la şoarece (MMTV) pentru a studia agoniştii receptorilor androgeni şi glucocorticoizi. Celulele MDA-MB exprimă atât receptorii glucocorticoizi cât şi receptorii androgeni, servind astfel ca o celulă gazdă ideală pentru reporterii construiți.

Ca un exemplu practic, datele obținute cu ajutorul reacțiilor care implică genele reporter în condițiile HTS, sunt prezentate în figura 1.5 şi tabelul 1.2. Celulele transfectate stabil cu gena reporter a luciferazei au fost aplicate într-o placă cu 384 de godeuri şi dozate cu diluții seriate ale unui compus care activează promotorul genei reporter. După o incubare de 24 de ore, celulele au fost spălate, lizate şi a fost adăugat substratul luciferazei (LucLite2; PerkinElmer Life Sciences). Cantitatea exprimată de proteina luciferază s-a corelat direct cu cantitatea de substrat metabolizat într-un compus luminiscent, care a fost detectat cu ajutorul unui cititor de plăci luminometric (TopCount2 NXT; PerkinElmer Life Sciences). Datele prezentate au oferit informații asupra concentrației minime a compusului de referință pozitiv necesar ca standard pe fiecare placă pentru HTS a 100000 de compuşi. Pentru a obține rezultate de calitate pentru fiecare placă individuală în timpul HTS, este calculat un criteriu numit factor Z' (diferența dintre mediile semnalului de fond şi godeurile de control pozitiv) şi deviația standard (SD) a godeurilor de control pentru fiecare placă. Din moment ce factorul Z' ia în considerare atât intensitatea semnalului, cât şi variația intrinsecă, el oferă o măsură a stabilității unei reacții. Screening-ul este considerat posibil dacă $0<Z'<1$; cu toate acestea, în practică, valoarea minimă a factorului Z' este deseori mai mare. O concentrație de cel puțin 3mM a agonistului în controlul pozitiv poate fi necesară pentru a obține o valoare a $Z'>0.5$. Astfel, în acest experiment concentrația controlului pozitiv a fost de 10mM.

Tabelul 1.2 Activarea genei reporter a luciferazei şi performanţa reacţiei

Concentraţia (μM)	Media a 8 godeuri	SD	Factorul Z'
0	6364	641	
0,1	6347	314	n.d.
0,3	9028	458	-0,238
1	12006	509	0,389
3	20436	1476	0,549
10	31292	1181	0,781
30	38343	2027	0,750

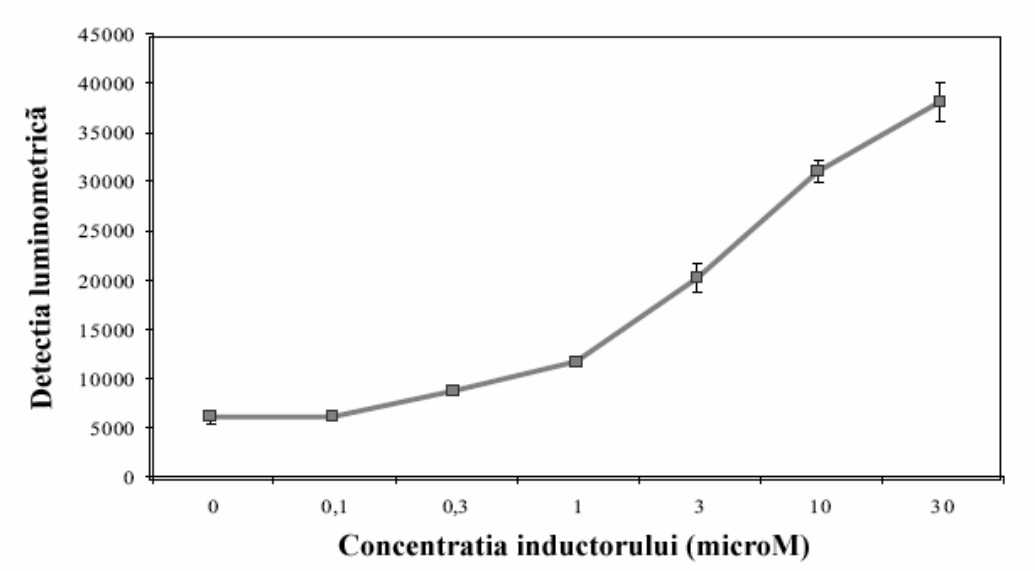


Fig 1.5 Inducţia dependentă de doză a genei reporter a luciferazei de către o substanţă inductoare utilizată ca şi control agonist în HTS. Fiecare valoare reprezintă media a 8 determinări separate, barele de eroare indică 1 SD. Media determinărilor luminometrice măsurate cu TopCount NXT (PerkinElmer Life Science) este reprezentată împotriva concentraţiei substanţei inductoare (mM). Valorile obţinute în absenţa compusului se referă la expresia bazală a genei reporter a luciferazei şi constituie fundamentul reacţiei.

Analizele genelor reporter pot fi înalt informative dacă produsul genei de interes şi calea de inducţie sunt bine caracterizate. Este necesar să se ţină cont de faptul că o genă reporter poate fi modulată de orice tip de stimul care infuenţează oricare dintre etapele cascadei de transducţie a semnalului cuplat. Astfel, efectele expresiei asupra genelor reporter observate ca răspuns la compuşii testaţi trebuie întotdeauna estimaţi prin reacţii care se adresează unor etape specifice ale căii, pentru a exclude mecanisme asociate indirect cu ţinta de interes.

Deşi în general expresia genelor reporter nu influenţează homeostazia celulei, un anumit component artificial este introdus în sistem. În primul rând, este necesar sa se stabilească în ce măsură calea de transducţie a semnalului ce conduce la activarea unui anumit promotor este prezentă şi funcţională activ în celulele de interes. Introducerea unei gene reporter în celule poate să perturbe caracteristicile transcripţionale normale, datorită eliminării unor factori transcripţionali sau prin efectele de poziţie datorate integrării plasmidului în timpul generării clonelor celulare stabilizate. De aceea, trebuie să existe grijă în alegerea promotorului şi a liniei celulare în care se realizează analiza genei reporter. Limitările pot să apară în legatură cu liniile celulare utilizate, metodele de transfecţie şi eficienţa expresiei genei reporter. Nu în ultimul rând, deşi generarea liniilor celulare bine caracterizate din punct de vedere al genelor reporter este consumatoare de timp, ele constituie un sistem foarte eficient pentru programele HTS.

1.3.2. Teste de detecţie genică pentru optimizarea modulării compuşilor activi farmacocinetici

Utilizarea array-urilor de expresie genică pentru monitorizarea simultană a expresiei a sute sau mii de gene a fost menţionată anterior. Array-urile de expresie sunt metode utile nu numai pentru caracterizarea fenotipurilor de expresie ale celulelor şi ţesuturilor în vederea clasificării, dar ele permit şi monitorizarea impactului mutaţiilor sau medicamentelor asupra fenotipului celular. Array-urile sunt utilizate pe scară largă în studiile toxico- şi farmacogenomice. În plus, datele obţinute au fost utilizate pentru crearea unor modele predictive în scop diagnostic.

Utilizarea array-urilor de expresie necesită producerea unor probe adecvate pentru hibridizare, care pot fi foarte dificil de obţinut. Mai mult, analiza seturilor de date obţinute necesită soft-uri sofisticate, precum şi cunoştinţe cu privire la semnificaţia şi relevanţa multiplicităţii de răspunsuri observate. În unele cazuri, numai o fracţie particulară a genelor măsurate oferă informaţii referitoare la ţinta cercetată. Thomas şi colab. (2001) au analizat expresia a 1200 de transcripturi din ficat utilizând array ADNc, după administrarea la şoareci a 24 de tratamente diferite

divizate în cinci categorii. Un set de 12 transcripturi a fost identificat şi considerat de importanță diagnostică pentru clasificarea tratamentului în clase de toxicitate. Interesant, adăugarea altor transcripturi a condus la un declin al acurateței predictive a „individualității" unui profil terapeutic specific. Într-un studiu similar, Bartosiewicz şi colab. (2001) au utilizat un set de 260 de gene implicate în faza I şi II a metabolismului medicamentelor pentru a testa efectele a 10 substanțe toxice asupra profilurilor de expresie în diferite țesuturi la momente diferite ale expunerii şoarecilor. Diferite grupuri de clase chimice pot fi corelate cu profiluri de expresie diferite ale unui număr relativ scăzut de transcripturi. Studii similare ale profilurilor expresiei evaluate pe celulele HepG2 şi pe ficat de şobolan tratat au aratat că numai cu un set de gene înalt selectate pot fi identificate clase diferite de substanțe chimice prin intermediul modulării expresiei setului de gene selectate.

În zilele noastre, cea mai bună metodă pentru evaluarea profilului expresiei genice *in vivo* constă în utilizarea oligonucleotidelor sau microarray-urilor ADNc sau a chip-urilor de gene. Cu toate acestea, datorită costurilor crescute şi a efortului depus pentru prepararea probelor (care în general exclude o metoda de înaltă capacitate) studiile au fost efectuate în special în faza tardivă a procesului de descoperire a medicamentelor. De aceea, una sau mai multe componente sunt analizate pentru modelele de expresie ale multor gene. Pentru a reduce uzura în faza tardivă a medicamentelor potențial candidate datorită efectelor adverse neobservate, sunt necesare sistemele de profil al expresiei justificabile pentru HTS. A fost descrisă o abordare care utilizează analiza genelor reporter. Albano şi colab. (2001) au selecționat un set de promotori care răspund la stres din genele Escherichia coli pentru a genera construcții ale genei reporter GFP ca o unealtă pentru screening-ul mecanicistic al medicamentelor antitumorale într-o placă cu 96 de godeuri. Zhu şi Fahl (2000) au generat clone celulare stabile HepG2 care exprimaă GFP sub controlul elementului de răspuns electrofil (EpRE), care permite HTS pentru inducția enzimelor fazei a II-a a metabolismului medicamentelor. Un alt avantaj al construcțiilor genelor reporter GFP este faptul că expresia poate fi detectată în celule vii, permițând monitorizarea facilă în dinamică, precum şi reversibilitatea inducției.

Utilizarea genelor reporter din liniile celulare pentru profilurile expresiei a fost mai profund documentată de Farr şi Todd (1998), care au stabilit un model de linii celulare ce conțin gena reporter pentru N-acetiltransferaza cloramfenicolului (CAT) sub controlul promotorilor indicatori pentru răspunsurile la stresurile celulare. Inducția unor construcții de reporteri de către compuşii chimici poate oferi indicații cu privire la acțiunea compuşilor la nivel subcelular. Astfel, construcțiile promotor-genă reporter exprimate în linii celulare bine caracterizate pot oferi sisteme utile pentru profilul compuşilor ținând seama de activarea căilor de transducție a semnalului recunoscut care se asociază cu anumite fenotipuri. Sistemul de analiză va detecta compuşi care modulează direct expresia genei reporter şi pe aceia care interferă cu expresia provocată prin stimuli externi cum ar fi factorii de creştere şi citokinele. Când un tablou de analize ale genelor reporter este utilizat pentru profilul compuşilor, modele de expresie similară pot demonstra mecanisme comparabile de acțiune ale compuşilor testați în celule intacte. Modificări ale modelelor expresiilor ca răspuns la căi de semnalizare specifice şi în linii celulare diferite pot aduce informații cu privire la specificitatea compuşilor testați. Aceste sisteme pot fi uşor adaptate pentru HTS şi pentru analiza în dinamică şi a dependenței de doză a inducției. În consecință, crearea profilului modulatorilor identificați sau a seturilor de compuşi rezultați din optimizarea modulării compuşilor activi farmacocinetici poate permite organizarea compuşilor în grupe cu răspunsuri farmacologice similare. De exemplu, activarea genelor reporter cuplate la elementul p53-responsiv (p53RE) va arăta că acel compus testat conduce la lezări ale ADN; activarea reporterilor sub controlul elementului de răspuns la xenobiotice (XRE) va conduce la inducția transcripționala a enzimelor ce catalizează metabolismul medicamentelor, precum citocromul P450 şi altele. Astfel, realizarea profilului genelor reporter *in vitro* cu un set de gene bine definite şi validate poate contribui nu numai la clasificarea compuşilor, dar şi la identificarea unor posibile efecte adverse ale compuşilor testați.

Recent, cu ajutorul unor tehnici mai sensibile de monitorizare a expresiei genice, a fost raportat un nou set de analize. În timp ce analizele genelor reporter au fost coroborate cu ideea vizualizării unui eveniment particular al expresiei genice prin

cuplarea cu o proteină care poate fi monitorizată cu uşurinţă, tehnicile noi monitorizează direct expresia genică prin cuantificarea nivelelor de ARNm pentru până la câteva mii de gene simultan. Mai mult, aceste tehnici nu necesită introducerea anterioară a unui sistem de detecţie ceea ce permite alegerea în funcţie de tipul de celulă sau ţesut derivate din organe.

Tabelul 1.3 oferă o privire de ansamblu asupra unor tehnici dezvoltate pentru aplicaţiile HTS care sunt disponibile în momentul actual.

Tabelul 1.3 . Tehnici pentru identificarea expresiei genelor

Tehnologia	**Metodologia**	**Gene ţintă**	**Probe**
SAGE	transcriptul capturat prin amprenta SAGE, identificarea şi cuantificarea prin secvenţierea concatemerelor seriate	HT-compatibil	puţine
GeneCalling (profilarea transcriptului)	amprentarea prin endonucleaze de restricţie a ADNc, confirmare prin PCR competitiv	96 de reacţii	puţine
TOGA	PCR bazat pe ADNc, identificarea ARNm cu capăt 3'poli(A) prin secvenţiere	256 de reacţii	puţine
Microarray/ oligoarray ADN	hibridizarea ARN total la sonde ale genelor aranjate pe chip-uri de silicon sau lame de sticlă	HT-compatibil	puţine
RT-PCR Cantitativ (Taqman^{TM})	eliberarea mediată prin PCR a unor sonde fluorogenice specifice genelor; limita de detecţie este invers proporţională cu concentraţia	puţine sonde	format cu 96 de godeuri
ADN ramificat (branched DNA) (Quantigene^{TM})	detecţia directă a ARNm prin hibridizarea cu un linker specific genei şi amplificarea sondei	1 sondă	format cu 96 de godeuri
HPSA^{TM}	detecţia directă a ARNm prin hibridizarea cu captură specifică genei şi amplificarea sondei	2 sonde	format cu 96 de godeuri

În funcţie de aplicabilitatea pentru HTS a acestor noi tehnologii, pot fi diferenţiate două mari clase. Dintre metode menţionăm analiza seriată a expresiei genice (SAGE), GeneCalling (realizarea profilului expresiei prin amprentarea cu endonucleaze de restricţie) şi analiza expresiei genice totale (TOGA), unde prepararea probei iniţiale este foarte dificilă, dar detecţia poate fi realizată în paralel pentru mai multe gene diferite. Aceste tehnici sunt denumite colectiv sisteme „deschise" deoarece nu este necesară nicio informaţie despre secvenţă şi virtual toate

genele induse de un compus particular pot fi detectate. Sistemele deschise pun sub semnul întrebării tehnologia ADN microarray, oferind o alternativă la costurile înalte şi la necesarul înalt al materialului inițial asociate cu aceste tehnici. În practică, ele se vor dovedi utile dacă trebuie analizate doar câteva probe pentru detecția produşilor mai multor gene diferite.

Reacția de polimerizare în lanț cantitativă (RT-PCR), tehnologia ADN ramificat (branched DNA) promovată de Bayer (Emeryville, CA) şi amplificarea de înaltă performanță a semnalului (high-performance signal amplification - HPSA^{TM}) promovată de Chromagen (San Diego, CA) pot detecta moleculele de ARNm. Acestea sunt denumite sisteme „închise" deoarece pot fi aplicate numai genelor cu secvență cunoscută. Totuşi, aceste metode pot fi utilizate pentru HTS deoarece reacțiile pot fi realizate în plăci, permițând procesarea simultană a mai multor probe. Mai mult, au avantajul de a fi mai flexibile şi pot fi realizate pe orice sursă şi detecția noilor gene necesită doar design-ul şi sinteza unor sonde specifice genelor. Aceste noi tehnologii promit o creştere a sensibilității, cu rezultate necompromise de efectele secundare datorate genelor reporter, dar încă nu sunt atât de larg utilizate ca sistemele genelor reporter.

1.4.Reacțiile celulare spațio-temporale şi analizele subpopulațiilor

Reacțiile celulare care se adresează nivelelor expresiei proteinelor, distribuției spațiale şi temporale ale proteinelor în interiorul celulei şi dinamicii semnalizării intracelulare sunt utilizate curent pentru o mai bună înțelegere a funcțiilor țintelor farmaeutice în celule. Exista un număr în creştere de reactivi pentru marcare şi de sonde fluorescente, incluzând anticorpii specifici țintei, enzimele complementare, coloranții (Alexa Fluor dye series; Molecular Probes), reactivii de afinitate şi proteinele fluorescente codificate genetic.

Sistemele care permit analize de mare capacitate ale celulelor includ tehnici bazate pe citometria în flux, precum sistemul farmacologic de mare capacitate recent descris [Edwards şi colab., 2001]. Acest sistem permite caracterizarea multifactorială

a celulelor, dar nu permite cuantificarea rearanjamentelor spaţiale din interiorul celulei.

Tehnologiile de imagistică microscopică recent dezvoltate au aplicaţii variate. Ele permit analiza unor funcţii celulare variate incluzând motilitatea celulară, morfologia celulară, motilitatea proteinelor în interiorul celulelor, localizarea proteinelor, mesagerii secunzi intracelulari şi măsurătorile „capătului" cascadelor de semnalizare. Dezvoltarea unui sistem de imagistică automat a făcut posibil screening-ul compuşilor într-un format bogat în informaţii. Avantajul major al imagisticii automate şi al tehnicilor de scanare îl constituie creşterea considerabilă a sistemelor de analiză de mare capacitate comparativ cu microscopia manuală. În cazul microscopiei cu fluorescenţă, multiple sonde fluorescente pot fi detectate şi cuantificate simultan.

Sistemul ArrayScan II a fost introdus în 1999 de către Cellomics [Brunet şi colab. 1999] şi a fost unul dintre primele instrumente de imagistică automate pentru screeningul bogat în informaţii de pe piaţă. Pentru moment, alte instrumente, software-uri şi hardware-uri au fost dezvoltate de câteva companii incluzând Acumen-Biosciences (www.acusite.co.uk), Amersham Bioscience (www.amersham.com), Applied Biosystems (www.appliedbiosystems.com), Q3DM (www.q3dm.com), CompuCyte (www.compucyte.com), Kinetics Imaging (www.kinetikimaging.com), Universal Imaging (www.imagel.com), Axon Instruments (www.axon.com) şi Evotec OAI (www.evotecoai.com).

Progresul rapid în dezvoltarea sistemelor analitice pentru analizele subcelulare în combinaţie cu reactivii de marcare pentru identificarea specifică a moleculelor de interes va permite analiza semnalizării specifice şi a etapelor metabolice prin sisteme de analiză de mare capacitate.

1.4.1. Anticorpii specifici etapei de fosforilare

De un interes deosebit pentru imagistica automată sunt reactivii dependenţi de o activitate, precum anticorpii fosfospecifici care permit analiza selectivă a căilor de semnalizare din celule. Fosforilarea şi defosforilarea proteinelor de către fosfataze şi

kinaze sunt procese componente ale rețelei complexe de semnalizare a proceselor dinamice fin reglate. Fosforilarea proteinelor se traduce frecvent în redistribuția subcelulară a moleculelor semnalizatoare cheie, care este importantă pentru activitatea lor biologică. Distribuția spațială a două proteine cheie în semnalizare în urma fosforilarii, kinaza extracelulară reglată de semnal (Erk) şi MAP kinaza p38, a fost analizată cu anticorpi fosfotirozin-specifici care recunosc numai forma fosforilată a proteinei [Vogt şi colab., 2001]. Expunerea celulelor la un inhibitor al fosfatazei Cdc25 s-a tradus într-o acumulare nucleară dependentă de concentrație a fosfo-Erk şi fosfo-p38, dar nu şi a factorului nuclear κB (NF-κB). Aceste experimente au aratat că inhibiția Cdc25 a crescut fosforilarea Erk şi acumularea sa în nucleu, indicând că statusul de fosforilare al Erk este reglat de către fosfataza Cdc25.

Un anticorp fosfo-histonic H3 care țintește situsul de fosforilare Ser10 al histonei H3 şi anticorpul fosfo-histonic H1 au fost utilizați pentru a detecta fosforilarea mitogen şi oncogen-stimulată în regiunile nucleozomale mici care sunt sensibile la hiperacetilare [Chadee şi colab., 1999].

Statusurile kinazei active au fost analizate cu un set de anticorpi monoclonali anti-kinazici fosfospecifici. Specificitatea anticorpilor pentru kinaza specifică a fost verificată prin analiza Western blot şi cu inhibitori specifici pentru kinazele din amonte. Utilizând citometria în flux multiparametrică, Perez şi Nolan (2002) au putut identifica subseturi de limfocite cu ajutorul a patru kinaze intracelulare active. Această tehnică permite pentru prima data investigarea simultană a diferitelor kinaze active într-o singură celulă. În timp ce această tehnologie poate fi cel mai bine aplicată celulelor în suspensie, microscopia de înaltă capacitate este tehnica cea mai adecvată pentru celulele aderente. În plus, aplicațiile microscopiei permit analiza distribuției spațiale intracelulare care nu este posibilă prin citometria în flux.

Celulele în mitoză sunt caracterizate prin creşterea nucleolinei fosforilate, o proteină nucleară fosforilată în celulele care intra în mitoză. Utilizând un anticorp monoclonal care recunoaşte specific nucleolina fosforilată, Mayer şi colab. (1999) au dezvoltat o analiza de mare capacitate „whole-cell immunoblot”.

Componentele care opresc celulele în mitoză prin noile metode de acțiune au putut fi identificate după sortarea componentelor cu o a doua reacție.

Alte modificări ale proteinelor precum acetilarea pot fi de asemenea detectate cu anticorpi specifici. Organizarea cromatinei active transcripțional şi activitatea acetiltransferazei şi deacetilazei histonelor nucleare au fost investigate prin utilizarea unui anticorp specific acetil-histonei H3. Componentele care afectează modificările stimulate de ligand în structura cromatinei pot fi cel mai bine scanate cu aceşti anticorpi prin tehnici de imagistică automate.

1.4.2. Anticorpi specifici țintelor proteice

Multe proteine joacă roluri importante atât în citoplasmă cât şi în nucleu. Deci, ele necesită traficul dintr-un compartiment în altul pentru a-şi îndeplini funcțiile. Exemple tipice sunt factorii de transcripție citoplasmatici latenți sau factorii de transport nucleari. Au fost descrise reacții pentru factorii de transport nuclear care utilizează formarea heterocarionului în asociere cu proteine fluorescente.

Traficul factorilor de transcripție citoplasmatici latenți în urma activării către nucleu poate fi monitorizat şi cuantificat prin imagistica fluorescentă automată. Translocația în nucleu a NF-κB indusă de IL-1 şi de factorul de necroză tumorală α a fost cuantificată cu ajutorul aplicațiilor tehnnologiei Cellomics ArrayScan II [Ding şi colab, 1998].

Celulele nestimulate conțin NF-κB inactiv distribuit în interiorul citoplasmei care poate fi detectat cu anticorpi specifici pentru NF-κB legați la anticorpi secundari marcați fluorescent. În celulele stimulate cu IL-1α, cea mai mare parte a NF-κB este activată şi este transportată în nucleu într-o manieră dependentă de moment şi de doză (fig. 1.6 şi 1.7). În urma stimulării de către IL-1α, celulele HeLa au fost analizate cu ajutorul sistemului ArrayScan II utilizând un software specific care permite analiza cantitativă a fluorescenței în nucleu şi în citoplasma adiacentă. Celulele sunt identificate ca obiecte de către software prin colorarea nucleară cu Hoechst 33324 sau DAPI şi sunt acoperite pentru măsuratori ale fluorescenței nucleare şi citoplasmatice (fig 1.8)

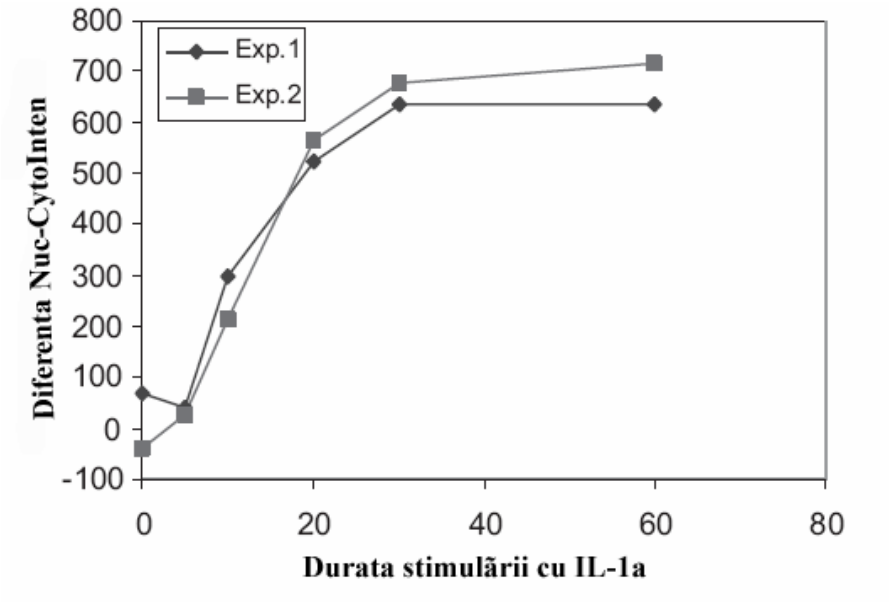


Fig 1.6 Translocaţia nucleară a NF-κB în dinamică. Celulele HeLa au fost stimulate cu 1 ng/ml de IL-1a la 37°C. Sunt reprezentate valorile medii a 100 de celule măsurate în fiecare godeu în două experimente separate (Exp 1 si Exp 2). Nuc-CytoInten = intensitatea fluorescenţei nucleare minus intensitatea fluorescenţei citoplasmatice.

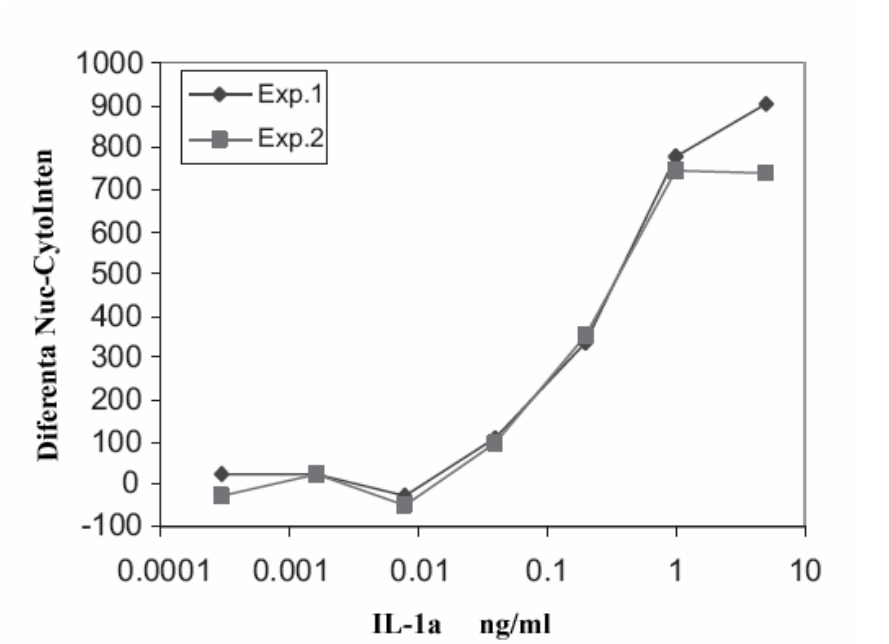


Fig 1.7 Relaţia doză-răspuns a translocaţiei nucleare a NF-κB indusă de IL-1a. Celulele HeLa au fost stimulate cu concentraţiile indicate de IL-1a pentru 30 de minute la 37°C. Sunt reprezentate valorile medii a 100 celule măsurate per godeu în două experimente separate (Exp 1 si Exp 2). Nuc-CytoInten = intensitatea fluorescenţei nucleare minus intensitatea fluorescenţei citoplasmatice

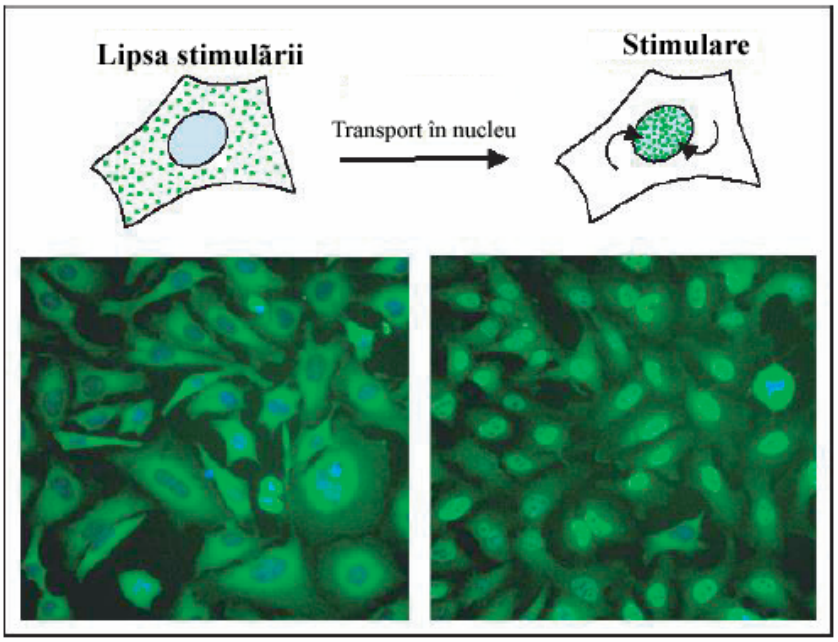


Fig. 1.8 Translocaţia NF-κB indusă de IL-1a în celulele HeLa. Celulele au fost marcate cu anticorp de iepure antip65 pentru NF-κB şi anticorp de capră anti-anticorpul de iepure Alexa Fluor 488. ADN-ul nuclear a fost marcat cu Hoechst 33342. NF-κB este cuantificat prin măsurarea intensităţii fluorescenţei verzi; nucleii apar albaştrii. Celulele nestimulate (stânga) prezintă fluorescenţa verde mai ales în citoplasmă, pe când celulele stimulate cu IL-1a 2ng/ml 30 de minute la 37°C (dreapta) prezintă translocaţia NF-κB în nucleu.

1.4.3. Fuziunile Proteina-GFP

Tehnologiile prin ataşare au fost frecvent utilizate pentru monitorizarea traficului sau transportului moleculelor prin membrană în celule şi în interiorul celulelor. Liganzii extracelulari pot fi conjugaţi cu biotina şi apoi vizualizaţi cu streptavidina conjugată la o enzimă. Un experiment HTS a fost descris pentru internalizarea factorului de creştere epidermal (EGF) [De Wit şi colab., 2000]. Proteinele fluorescente contribuie semnificativ la înţelegerea dinamicii proteinelor în interiorul celulelor. Ele reprezintă “instrumente” importante şi adaosuri ideale pentru evaluarea în timp real, a evenimentelor moleculare în celulele vii, sub forma de proteine reporter sau proteine de fuziune.

Cea mai utilizată este proteina fluorescentă verde(GFP), izolată iniţial şi clonată din peştele cartilaginos Aequorea victoria. Un mare număr de variante GFP au fost realizate cu spectre de excitaţie şi emisie diferite, incluzând proteina

fluorescentă albastră intensificată (eBFP), proteina fluorescentă galbenă intensificată (eYFP) şi proteina fluorescentă azurie intensificată (eCFP). Natura structurilor acestor proteine evaluează aceste proteine ca extrem de stabile şi rezistente la degradare de către majoritatea proteazelor. Acest înalt nivel de stabilitate nu reprezintă în mod necesar un avantaj pentru aplicațiile celulare.

Dacă se doreşte monitorizarea modificărilor expresiei genice prin reacțiile reporterilor transcripției, este de preferat un reporter cu un timp de înjumătățire redus. În consecință, au fost create forme cu timp de înjumătățire redus ale eGFP pentru a putea fi utilizate ca proteine reporter ale transcripției şi ele sunt denumite proteine eGFP destabilizate. În acelaşi timp, au fost clonate alte proteine fluorescente din nevertebratele marine,cum ar fi proteinele fluorescente din recifurile de corali. Combinația variantelor spectrale distincte ale proteinelor fluorescente permite o mare varietate de aplicații, precum analiza simultană a cascadelor expresiei mai multor gene sau translocația diferitelor proteine.

Măsurarea co-internalizarii β-arestinei legată de GPCR poate fi utilizată pentru monitorizarea activării şi reciclării receptorului. Barak şi colab. (1997) au demonstrat cu ajutorul microscopiei confocale, translocația proteinelor de fuziune β-arestina-2-GFP din citoplasma la GPCR ancorați la membrană. Acest lucru a fost demonstrat pentru mai mult de 15 GPCR activați de ligand în celulele HEK-293. În absența activării receptorului, β-arestinele sunt distribuite în citosol şi sunt absente în nucleu. Dupa adăugarea ligandului la celule, proteinele de fuziune β-arestina-2-GFP sunt translocate prin membrana plasmatică şi mai departe prin veziculele de endocitoză. Acumularea proteinelor GFP-ataşate poate fi cuantificată cu ajutorul tehnicilor imagistice fluorescente.

Cu ajutorul proteinei de fuziune β-arestina-2-GFP, se realizează co-internalizarea arestinei cu receptorul 1 al TRH (thyrotropin-releasing hormone) ca răspuns la agonist, reacția fiind monitorizată şi fotografiată. NORAK Biosciences (Research Triangle Park, NC; www.norakbio.com) explorează mişcarea complexului arestina-GFP sub denumirea de tehnologia Transfluor™ ca o platforma HTS

aplicabilă pe scară largă, stabilă, care permite identificarea modulării compuşilor semnalizării prin GPCR.

Internalizarea receptorului şi traficul său au fost explorate prin utilizarea liganzilor marcați fluorescent, ca de exemplu ligandul pentru receptorul transferinei [Ghosh şi colab., 2000]. Screening-ul a fost condus cu un sistem ArrayScan II, iar internalizarea şi reciclarea receptorului transferinei cu ligandul legat a putut fi monitorizată şi cuantificată.

Activarea şi internalizarea GPCR a fost monitorizată cu ajutorul proteinelor de fuziune fluorescente GPCR-GFP. Conway şi colab. (1999) au utilizat sistemul de screening ArrayScan pentru a monitoriza internalizarea receptorului pentru hormonul paratiroid şi receptorului β2-adrenergic după stimularea de către liganzii specifici.

Alte exemple în care a fost utilizată fuziunea cu proteine fluorescente pentru a cuantifica traficul proteinelor includ translocația nucleară a calmodulinei sau reglatorul transcripțional legat de membrana după hidroliza fosfoinozitidului.

În alte aplicații, domeniile de translocație precum domeniul C2 sensibil la Ca^{2+} al protein kinazei Cδ a fost fuzionat cu YFP şi exprimat în celule leucemice de şobolan. Tehnologia „evanescent wave single-cell array" (radiații cu scădere exponențială a intensității în funcție de distanță) a fost aplicată ca o tehnologie imagistică pentru a monitoriza traficul proteic dupa adiția factorului activator plachetar.

Analiza simultană a populațiilor celulare mixte poate fi efectuată prin transfecția fiecărei linii celulare cu o singură proteină de fuziune fluorescentă. Vectorii BFP şi YFP au fost utilizați pentru transfecția stabilă a două linii diferite de cancer colonic, linia parentală cu gena K-ras mutantă şi o variantă unde gena mutantă a fost deletată. Pentru a realiza screening-ul compuşilor care omoară selectiv numai varianta tumorigenică cu gena mutantă, ambele populații au fost amestecate şi testate simultan pentru supraviețuirea celulară utilizând măsurători ale intensității fluorescenței. Au putut fi identificați compuşi care afectează preferențial celulele cu alela ras mutantă.

1.4.4. Fluorescență cu transfer de energie prin rezonanță (FRET)

FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) a devenit o metodă utilizată frecvent pentru studiul dinamicii proteinelor în celule. FRET este bazată pe transferul energiei absorbite de o moleculă fluorescentă la o altă moleculă, determinând excitarea celei de-a două molecule. Pentru a realiza FRET, cele două molecule fluorescente cu spectre diferite de excitație/emisie trebuie sa fie într-o strânsă proximitate. Cea mai generală strategie pentru crearea unor astfel de indicatori este interpunerea domeniului de interes sensibil conformațional între două mutante GFP. În cazul legării ligandului sau al modificării domeniului, cele două jumătăți fluorescente se găsesc în strânsă proximitate, ceea ce permite realizarea FRET.

Într-un studiu de pionierat, Mahajan şi colab. (1998) au utilizat construcții plasmidice care au exprimat proteinele de fuziune GFP-Bax şi BFP-Bcl-2. Bax şi Bcl-2 sunt doi modulatori cheie ai apoptozei, dar interacțiunea lor directă nu fusese niciodată demonstrată la nivel celular. Pe baza FRET s-a evidențiat interacțiunea directă a celor două proteine la nivelul mitocondriei .

FRET a fost de asemenea aplicată pentru a determina activitățile kinazei în celule vii. Pentru acest scop, au fost creați reporteri constând din fuziunea CFP, un domeniu de legare a fosfo-aminoacizilor, un substrat de consens pentru kinaza de interes şi YFP. În celulele transfectate cu reporteri şi stimulate pentru activitatea particulară a kinazei, proteina de fuziune după fosforilare a suferit modificări conformaționale şi a permis realizarea FRET între YFP şi CFP. Modificarea raportului între emisia galbenă şi azurie a putut fi cuantificată şi determinată temporal şi spațial. Aceasta tehnologie a fost aplicată cu succes pentru protein kinaza A şi cele trei tirozin kinaze Abl, Scr şi receptorul EGF.

Într-o abordare similară, Honda şi colab. (2001) au utilizat un indicator fluorescent codificat genetic pentru a investiga dinamica GMPc în celule individuale. Indicatorul GMPc a fost construit din mutanți cu deleții ai protein kinazei GMPc dependente între mutanții galben şi azuriu ai GFP. Legarea GMPc la indicatorul proteinei de fuziune a alterat FRET dar şi raportul între emisia galbenă şi azurie, care a fost selectiv peste AMPc. Prin utilizarea acestei metode, dinamica temporală şi

spațială a nivelelor de GMPc intracelular în fibroblastele plămânului fetal de şobolan şi în neuronii Purkinje a fost monitorizată în urma adăugării diferiților stimuli.De asemenea au fost studiați senzori similari pentru AMPc .

Senzorii bazați pe FRET au fost de asemenea utilizati pentru a demonstra comportamentul spațio-temporal al proteinelor de legare a GTB în urma stimulării celulare cu factori de creştere. A fost creată o proteină de fuziune ce cuprinde H-Ras, domeniul de legare al Ras la Raf şi a fost flancată de o pereche de mutanți galben şi azuriu ai GFP. H-Ras a fost înlocuită în cea de-a doua construcție cu proteina analoagă Rap1. Activarea căii Ras/Rap de către factorii de creştere a indus FRET. Localizarea spațio-temporală a proteinei de fuziune a indicat că stimularea de către EGF a celulelor COS-1 a activat Ras la nivelul membranei plasmatice, iar Rap la nivelul regiunii perinucleare. În plus, acest studiu a demonstrat că factorii de creştere activează numai o subpopulație a Ras şi Rap şi numai la nivelul unor arii restrânse din celulă. Această tehnologie în combinație cu imagistica celulară va creşte sensibilitatea şi va facilita abordările HTS celulare pentru evenimente specifice ale semnalizării celulare.

1.4.5. Activarea GPCR prin biolominiscența cu transfer de energie prin rezonanță (BRET)

BRET (Bioluminiscence Resonance Energy Transfer) este un fenomen care apare în mod natural. Peştele cartilaginos A. victoria sau Renilla reniformes produc fluorescența verde prin BRET. În cazul anterior al emisiei de lumină albastră, aequorina se asociază cu GFP, în timp ce în ultimul caz, energia generată în urma degradării coelanterazinei de către luciferază este transferată către GFP. Acest transfer apare numai în cazul în care luciferaza şi GFP formează un heterodimer. BRET a fost utilizat pentru a demonstra interacțiunea proteinelor ceasului circadian de la cianobacteriile exprimate în E. coli. Mai recent, BRET a fost aplicată pentru studiul activarii GPCR de câteva grupuri de cercetatori [Angers şi colab., 2000]. Pentru a demonstra dimerizarea receptorului β2-adrenergic (β2-AR), construcțiile β2AR-Renilla luciferaza şi β2AR-GFP supus efectului Doppler (redshift) (YFP) au

fost co-exprimate în celulele HEK-293. Apariția BRET a fost un indicator al dimerizării receptorului. În acelaşi studiu, β-arestina, cunoscută a se asocia cu domeniul intracelular al receptorilor cuplați cu proteina G activați, a fost exprimată ca o construcție arestina-YFP împreună cu luciferaza- β2AR-Renilla. A fost prezentă BRET între două proteine, dar a fost în totalitate dependentă după activarea receptorului, indicând asocierea arestinei cu domeniul intracelular al β2AR în starea activă a receptorului. Aceasta reacție a fost dezvoltată ca o tehnologie pentru HTS de către PerkinElmer Life Sciences.

1.4.6. Teste de detecție prin complementaritate a fragmentelor proteice (Protein Fragment Complementation Assays - PCA)

Metodele descrise anterior pentru studiul interacțiunilor proteină-proteină sunt asociate cu unele neajunsuri. Dublul sistem al drojdiilor este bazat pe transcripție, care necesită disponibilitatea proteinelor în nucleu. În FRET, proteinele fluorescente trebuie să fie exprimate în celule la nivele relativ înalte şi interacțiunea trebuie sa aibă loc într-un asemenea mod încât proteinele să fie în strânsă proximitate pentru a permite transferul energiei.

Complementarea enzimelor şi utilizarea PCA în studiul interacțiunilor proteină-proteină a fost dezvoltată pentru β-galactozidaza la E. coli, dihidrofolat reductaza (DHFR) şi mai recent pentru β-lactamaza. În cazul β-galactozidazei, doi mutanți cu deleții, complementari sunt fuzionați cu două proteine pentru a proba interacțiunea. Numai în cazul în care cele două proteine interacționează ele sunt cele două părți ale galactozidazei forțate să se completeze una pe cealaltă şi să exercite activitate enzimatică. Sistemul a fost dezvoltat pentru demonstrarea interacțiunii FRAP şi FKBP12 în prezența rapamicinei.

Mai recent, complementarea β-galactozidazei a fost utilizată pentru a crea sisteme HTS pentru screening-ul antagoniştilor dimerizării EGF-R mediată de către EGF. Pentru acest scop, mutanții cu deleții complementari ai β-galactozidazei au fost fuzionați cu domeniile intracelulare ale EGF-R şi cotransfectate în mioblaste de şoarece C2C12. Activitatea enzimei a fost reconstruită în urma adăugării EGF la

celulele din cultură. Cu ajutorul acestei reacții, adaptată la un format cu 384 de godeuri, modulatorii cu molecule mici primar identificați în reacția EGF-R au fost supuşi screening-ului pentru specificitate cu doi mutanți cu deleții complementari ai β-galactozidazei fuzionați cu β2-adrenoreceptorul şi β-arestina umană. Prin utilizarea reactivilor chemiluminiscenți şi a galactozidazei fluorescente, această tehnică permite măsurarea interacțiunilor proteină-proteină în celulele vii pentru aplicații HTS.

Reasamblarea DHFR activ din fragmente create rațional a fost realizată de către Pelletier şi colab. (1998) într-un sistem procariot. DHFR a E. coli este inhibată selectiv de către antifolatul trimetoprim. DHFR murin poate salva celulele E. coli. Fragmentele complementare ale DHFR murin fuzionate cu proteine homo- sau heterodimerizate au fost utilizate pentru a transforma E. coli crescute într-un mediu cu trimetoprim. Supraviețuirea a fost considerată ca o măsură pentru interacțiunile proteice şi complementarea enzimei. În alt studiu, partenerii proteici fuzionați pentru complementarea fragmentelor DHFR murin au fost introduşi în celule de mamifere DHFR-negative crescute în absența nucleotidelor. Celulele în care proteinele se asociază şi DHFR poate complementa sunt capabile să supraviețuiască în aceste condiții. Ca o alternativă, interacțiunea proteică şi complementarea DHFR pot fi monitorizate prin adăugarea de metotrexat conjugat cu fluoresceină. Metotrexatul se leagă la DHFR numai în condițiile co-exprimării şi reasamblării fragmentelor complementare. Semnalele fluorescente pot fi monitorizate prin microscopie fluorescentă FACS sau prin metode spectroscopice utilizate în HTS. Complexul FKBP-rapamicina-FRAP şi activarea receptorului pentru eritropoietină au fost utilizate ca sisteme model [Remy, Michnick, 1999].

Mai recent, reacția PCA-DHFR a fost utilizată pentru a analiza totalitatea rețelelor biochimice în celule vii. Celulele ce exprimă perechi de proteine asociate au fost selectate şi metotrexatul conjugat cu fluoresceina, care se leagă la DHFR reconstituit a fost aplicat pentru a localiza partenerii proteici interacționați şi pentru a studia inhibitorii care previn interacțiunea. Aceeaşi metodă a fost utilizată cu succes pentru protoplastele plantelor care exprimă fragmente complementare ale DHFR fuzionate cu proteinele interacționate.

Legarea metotrexatului conjugat cu fluoresceina ca o măsură a interacțiunii proteină-proteină a fost monitorizată prin microscopie fluorescentă [Subramaniam şi colab., 2001].

1.5. Analizele fenotipice

1.5.1 Proliferarea/Respirația/Toxicitatea

Multe reacții pentru citotoxicitate şi proliferare se bazează pe măsurarea radioactivității şi măsurarea încorporării nucleotidelor marcate radioactiv precum [H^3] timidina în ADN-ul celular. Deşi foarte sensibilă, reacția ce utilizează [H^3] timidina este relativ costisitoare şi consumatoare de timp şi presupune manipularea şi înlăturarea deşeurilor radioactive. Alte reacții de citotoxicitate, precum MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5difeniltetrazolium bromide], Alamar Blue, lactat dehidrogenaza şi conținutul de ATP, necesită adiția unor reactivi specifici pentru generarea semnalului.

Dintre aceste tehnici, cea mai utilizată este MTT. Această sare de tetrazoliun este redusă în interiorul mitocondriilor celulelor pentru a forma un precipitat colorat formazan. Utilitatea MTT este limitată de faptul că poate fi susceptibilă la interferența cu medicamentele, fie prin reacția cu grupările reducătoare ale medicamentelor, fie prin difuzarea absorbanței ce rezultă din precipitarea în spectrul vizibil a luminii absorbite de medicamente. Măsurarea viabilității celulare prin reacția MTT se bazează pe reacția sa cu succinat dehidrogenaza mitocondrială, care poate ea însăşi să perturbe celulele. Mai mult, testul în sine nu este reversibil şi, datorită faptului că se realizează o citire la finalul reacției, citirea pentru fiecare moment necesită o reacție separată. Trebuie notat faptul că reacțiile de toxicitate şi proliferare sunt utilizate atât separat şi independent una față de cealaltă, cât şi în combinație. Combinația ambelor reacții permite o investigare detaliată a efectelor compuşilor asupra unei linii celulare particulare. Reacțiile omogene şi reversibile sunt în mod considerabil necesare. Sistemul Oxygen Biosensor System (OBS^{TM}; BD Biosciences, Bedford, MA) poate fi privit că un prototip reprezentativ. În acest sistem nu este necesară adăugarea niciunui reactiv pentru generarea semnalului.

OBS este o reacție realizată într-o microplacă care permite monitorizarea cinetică a oxigenului dizolvat. Colorantul sensibil la oxigen este învelit cu o matrice de silicon care este permanent atașată de baza fiecarui godeu al microplăcii. Matricea permeabilă pentru gaze permite oxigenului din vecinătatea colorantului să fie în echilibru cu oxigenul din mediul lichid. Oxigenul atenuează capacitatea colorantului de a emite fluorescența într-o manieră predictibilă, dependentă de concentrație. Prin urmare, pe măsură ce oxigenul este depletat din godeu (celulele consumă oxigenul din mediul înconjurator pe măsură ce cresc), concentrația oxigenului în matrice descreşte şi fluorescența creşte. Nivelul fluorescenței se corelează direct cu consumul de oxigen din godeu. Consumul de oxigen este în legatură directă cu numărul sau viabilitatea relativă a celulelor din fiecare godeu. Orice reacție care poate fi legată de consumul sau generarea de oxigen poate fi potențial măsurată de către acest sistem (Fig. 1.9). Semnalul este dinamic şi este citit în timp real. Probele pot fi citite oricât de frecvent şi de câte ori se doreşte. Semnalul este complet reversibil şi va creşte pe măsură ce celulele proliferează şi va descreşte pe măsură ce celulele mor, oferind o imagine completă a cineticii proliferării şi toxicității.

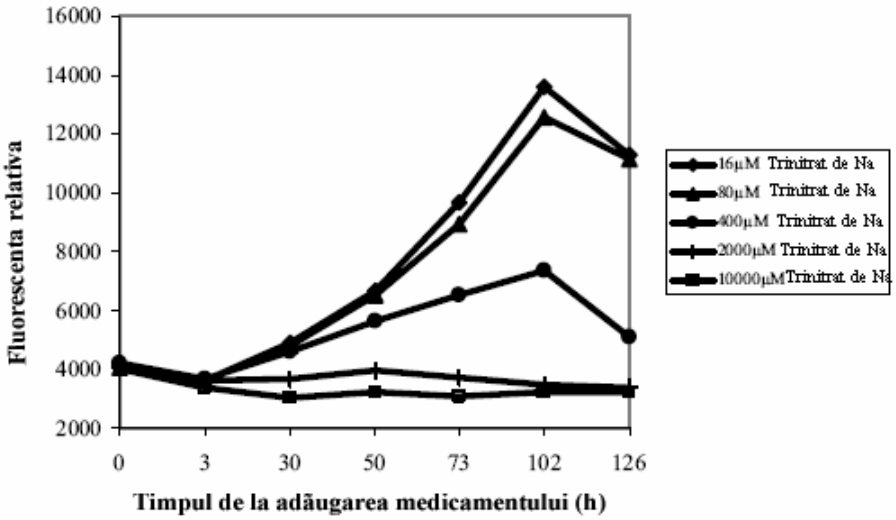


Fig 1.9 Consumul de oxigen de către celulele HeLa în urma expunerii la trinitrat de sodiu. Celulele ($1x10^5$), au fost adăugate în godeuri separate ale unei plăci cu biosenzori pentru oxigen şi tratate cu trinitrat de sodiu în concentrațiile indicate. Celulele au fost cultivate şi fluorescența a fost măsurată la momentele indicate. Concentrațiile micromolare mici ale trinitratului nu au influențat creşterea celulelor HeLa. În schimb, concentrațiile micromolare ale trinitratului de Na sunt toxice şi fluorescența relativă este menținută la un nivel constant. Descreşterea consumului de oxigen la 126 de ore după adăugarea medicamentului indică faptul că celulele au confluat şi au încetat să prolifereze.

1.5.2. Apoptoza

Apoptoza, sau moartea celulară programată, este unul dintre cele mai complexe procese celulare. Evenimentele timpurii şi tardive care apar în celulele supuse apoptozei cuprind activarea diferitelor caspaze, modificări ale citoscheletului, modificări ale potențialului membranei mitocondriale şi a masei mitocondriale, condensarea sau fragmentarea nucleară, mişcarea de *flip* a fosfatidilserinei pe fața externă a membranei celulare şi dezorganizarea membranei plasmatice.

Modificări ale morfologiei nucleare, reorganizarea actinei şi a potențialului şi conținutului mitocondriei pot fi detectate şi cuantificate prin analiza multiparametrică a apoptozei [Woo şi colab., 1999]. Mărirea sau îngustarea ariei nucleare şi distribuția cromatinei în interiorul nucleului este analizată prin colorarea celulelor cu un colorant ADN fluorescent, precum DAPI sau Hoechst 33342.

Gruparea filamentelor intracelulare de actină F şi mărirea conținutului în actină a celulelor apoptotice sunt detectate cu ajutorul faloidinei fluorescente. Această falotoxină, izolată din ciuperca Amanita phalloides, se leagă foarte înalt specific la actina F şi poate fi marcată cu un colorant fluorescent. Cu toate acestea, creşterea conținutului de actina F nu este observată în toate cazurile în celulele apoptotice, depinzând de tipul de celulă sau de inducator.

Colorantul cationic specific mitocondriilor, Mitotracker^{R} Red, care se acumulează în mitocondriile active, este utilizat pentru a estima potențialul membranar şi conținutul mitocondrial [Camilleri-Broet şi colab., 1998]. În ambele cazuri, cantitatea de colorant de la nivelul mitocondriei este o masură a nivelului apoptozei. În cazul aplicației multiparametrice a apoptozei, algoritmul ArrayScan II nu numai că cuantifică marcajul, dar ia în considerare distribuția colorantului fluorescent în compartimentele celulare şi calculează fragmentarea nucleară şi creşterea conținutului mitocondial.

Acest algoritm a fost aplicat cu succes în detecția apoptozei induse de anumiți compuşi şi poate fi utilizat pentru HTS.

1.5.3. Diferențierea

Celulele stem umane de diferite tipuri au capacitatea de a se diferenția într-un număr de tipuri de celule mature.Asemenea celule stem fiind în mod curent utilizate în transplantul de măduvă osoasă şi în cercetarea medicamentelor. Noi medicamente, precum factorul stimulator al coloniilor de granulocite şi eritropoietina au fost create pentru a acționa direct asupra acestor celule, fiind esențiale pentru succesul transplantului de maduvă osoasă. Expansiunea progenitorilor din maduva osoasă este extrem de sensibilă la o varietate de chimioterapice şi alți agenti toxici. În unele cazuri, efectele adverse toxice ale medicamentelor sunt specifice pentru liniile hematopoietice.

În trecut, utilizarea progenitorilor hematopoietici pentru descoperirea medicamentelor pe baza analizelor de mare capacitate şi screening-ul toxicologic era limitată de disponibilitatea țesutului. Ținând seama de disponibilitatea actuală a progenitorilor hematopoietici umani de înaltă calitate, impasul curent îl constituie utilizarea acestor celule în reacțiile fenotipurilor lor de diferențiere.

Cea mai utilizată reacție *in vitro* pentru a determina răspunsul diferențierii celulelor progenitoare hematopoietice este reacția coloniei [Eaves, 1995]. Această reacție utilizează populații progenitoare selectate din măduva osoasă umană, cordonul ombilical sau sângele periferic mobilizat în reacții clonogenice într-un mediu semi-solid. După o perioadă de 14 zile apar colonii ale diferitelor tipuri de celule sanguine diferențiate care sunt numărate manual. Diferite tipuri de colonii sunt identificate datorită morfologiei lor (mieloide sau eritroide) sau prin tehnici de colorare citochimică (megacariocite). Deşi parametrii acestei reacții au fost optimizați pentru a obține date cantitative, rezultatele extrem de reduse şi natura subiectivă a acestei reacții determină anumite probleme atunci când reacția este utilizată pentru screening-ul bibliotecii de compuşi chimici, descoperirea inițiala a medicamentelor şi screening-ul toxicității prin analize de mare capacitate.

Răspunsuri diferențiate pot fi obținute şi prin transfecția unei celule țintă cu o genă pentru un receptor legată de expresia unui marker specific de diferențiere.

Aceasta necesită transfecția unei celule ce conține cascade de transducție a semnalului caracteristice progenitorilor hematopoietici intacți.

O altă abordare a fost descrisă de Warren şi colab. (1995). Autorii au descris o imunoreacție celulară în care celulele sunt transferate într-o placă de reacție tratată cu fixator, şi fixate anterior incubării cu anticorpii primari şi secundari. Deşi această reacție a fost utilizată cu succes, transferul celulelor din placa de cultură în placa de reacție este consumator de timp şi nu este justificabil pentru HTS. Recent, această reacție a fost revizuită şi îmbunătățită de către Greenwalt şi colab. (2001) pentru a reduce numărul de manipulări necesare. La finalul perioadei de cultură, supernatantul culturii celulare este îndepărtat prin filtrare prin vacuum şi este adăugat un anticorp specific. Pentru a obține sensibilitatea dorită, anticorpii monoclonali au fost conjugați cu un chelat de europium DELFIA. Pe lângă sensibilitate, emisia relativ lungă a chelatului de europium DELFIA a permis utilizarea TRF (time-resolved fluorescence) pentru a preveni fluorescența fundalului endogen care este deseori o problemă semnificativă în analizele biologice. Îndepărtarea supernatantului culturii, a anticorpilor nelegați şi etape ulterioare de spălare sunt realizate într-o placă cu filtru cu 96 de godeuri. Deoarece este prezentă numai o contaminare redusă de la un ciclu de spălare la altul, îndepărtarea anticorpului nelegat este foarte eficientă. Sunt posibile spălari repetate fără pierderea celulelor. Pentru detecția semnalului, a fost adăugată o soluție de intensificare şi fluorescența europiului (excitare la 340 nm şi emisie la 615 nm) şi a fost măsurată cu ajutorul unui spectrofluorometru după o perioadă de 400 μs după întârzierea inițială de 400 μs.

1.5.4. Monitorizarea metabolismului celular

Determinarea directă a metaboliților la nivel celular sau *in vivo* oferă un sistem sensibil pentru evaluarea acțiunii medicamentului deoarece metaboliții reprezintă produşii finali ai proceselor reglatoare celulare. În plus, metaboliții celulari sunt în general mult mai puțin abundenți decât proteinele. În mediul celular, transducția semnalului, inițierea expresiei genice, sinteza proteinelor şi răspunsurile metabolice la stres trebuie să fie secvențiale. În ultimii ani s-au dezvoltat domeniile

metabolomicii, care investighează reglarea metabolică şi fluxurile celulelor individuale sau tipurilor de celule, şi metabonomicii, care determină profilurile biochimice sistemice şi reglarea funcției în organismul ca întreg prin analiza fluidelor biologice şi a țesuturilor [Nicholson şi colab., 2002].

Studiul efectelor adverse ale medicamentelor asupra celulelor sau a întregului organism prin metabonomică se bazează pe măsurători multiparametrice ale alterărilor metabolice în timp, ca răspuns la un factor de stres. Probele sunt cartografiate în funcție de compoziția lor biochimică [Nicholson şi colab., 1999].

Metaboliții s-au dovedit extrem de utili în caracterizarea fenotipurilor mutante, aşa cum s-a aratat recent la plante [Fiehn, 2002] şi în caracterizarea aşa-numitor mutații silențioase la drojdii [Raamsdonk şi colab., 2000]. Multe gene sunt silențioase, ceea ce înseamnă că dacă suferă o mutație, ele nu conduc la modificări fenotipice uşor observabile, precum alterări ale ratei de creştere. Rata de creştere poate să nu fie modificată deoarece concentrațiile diferiților metaboliți intracelulari sunt adaptate într-un mod care compensează efectul mutației. Corespunzător, analize metabolomice pot releva un fenotip al metaboliților anterior considerat ca silențios. În plus, cuantificarea modificărilor relative ale concentrației metaboliților cauzată de o mutație face posibilă identificarea unui situs de acțiune al produsului genic alterat, după cum a demonstrat Raamsdonk şi colab. (2000). Prin utilizarea aplicațiilor rezonanței magnetice nucleare sau spectrometriei de masă (MS)/cromatografia lichidă/MS, este posibilă analiza de mare capacitate. Aceasta va permite utilizarea analizelor metabolomice şi metabonomice în descoperirea medicamentelor ca o estimare sensibilă a acțiunii medicamentelor [Nicholson şi colab., 2002].

O abordare nouă, care permite analiza statusului metabolic în celule intacte, este analiza funcțională a celulelor vii în medii controlate fiziologic pe perioade mari de timp (biochip-uri). Eforturile sunt direcționate către dezvoltarea, adaptarea şi integrarea senzorilor microelectronici în biochip-uri miniaturizate pentru monitorizarea celulară multiparametrică (‘‘Cell Monitoring System’’). Unele dintre citirile posibile ale activităților celulare corespunzatoare sunt sumarizate în tabelul 1.4.

Monitorizarea schimburilor oxigenului celular poate fi utilizată pentru evaluarea activității mitocondriale. Mitocondria, pe lângă faptul că furnizează energie celulei, se presupune că este implicată şi în îmbătrânirea celulară accelerată datorată speciilor reactive de oxigen (ROS), în apoptoză şi mecanismele toxice ale multor medicamente. Monitorizarea activității mitocondriale prin coloranți lipofilici precum rodamina 123 prezintă riscul unor potențiale artefacte şi deci, tehnicile non-toxice şi neinvazive sunt în mod particular valoroase.

OBS a fost descrisă mai sus ca una dintre primele tehnici neinvazive pentru monitorizarea consumului de oxigen. O limitare a OBS este determinată de necesitatea unui număr mare de celule. Sistemul necesită cel puțin 50000 de celule în fiecare godeu pentru a produce rezultate viabile (un număr mai mic de celule nu consumă suficient oxigen pentru a compensa difuzia oxigenului din mediul exterior la biosenzor). Comparativ, tehnologiile bazate pe microsenzori permit, în condiții ideale, înregistrarea semnalelor de la o singură celulă.

Înregistrarea pH-ului bazată pe microsenzori este predominant utilizată pentru determinarea ratelor de acidifiere extracelulare. Câteva căi metabolice contribuie la acidifierea celulară şi, astfel, pot fi privite ca un indicator global al activității metabolice. În acest sens, modificările rapide (minute) tind să reflecte evenimentele activării celulare (semnalizarea mediată de receptor), pe când modificarile lente (ore) sunt de obicei atribuite creşterii sau morții celulare.

Monitorizarea adeziunii celulare (metastazele tumorale) sau a creşterii spre exterior (neurite) poate fi obținută prin creşterea celulelor plasate direct pe perechi de electrozi interdigitați. Semnalul impedanței celulare rezultă din izolarea prin membranele celulare. Dacă celulele sunt plasate pe electrozi, ele blochează fluxul curentului într-un mod pasiv şi astfel impedanța creşte. Astfel, impedanța unui sistem oferă o privire asupra comportamentului de adeziune al celulelor.

Această metodologie se bazează pe achiziția datelor utilizând dispozitive multiparametrice cu microsenzori. Un sistem de fluide pentru suplimentarea mediului de cultură/soluției de medicamente şi pentru realizarea măsurătorilor metabolice este conectat la chip. De asemenea este necesară menținerea precisă a condițiilor

micromediului *in vitro*. Parametrii celulari răspunzători de citirea chip-urilor cu senzori sunt activitatea metabolică (ratele acidificării extracelulare şi respiraţiei celulare), proprietăţile morfologice şi unele fluxuri ionice. Chip-urile cu senzor la scară mică necesită cantităţi foarte mici ale probei celulare.

Au fost dezvoltate metode care permit testarea unui număr mare de compuşi, iar formatul în plăci cu 96 de godeuri ar putea deveni disponibil în curând.

Tabelul 1.4. Citirile pentru sistemele multiparametrice de monitorizare a activităţii celulare

Citirea	Activitatea celulară corespunzatoare
Modificări ale nivelului de oxigen	activitate mitocondrială (metabolism energetic, îmbătrânire celulară, apoptoză)
Acidifierea mediului	indicator global pentru activitatea metabolică; modificări rapide: activări celulare; modificări lente: creştere sau moarte celulară
Modificari ale impedanţei	adeziune celulară: ataşarea la matrix, metastaze tumorale; excrescenţe celulare: diferenţierea neuritelor
Fluxul ionic	influx sau eflux de Ca^{2+}, Na^{+}, K^{+}
Metaboliţi	preluarea glucozei, excreţia lactatului
Emisia de lumină	inducţia expresiei genei reporter cuplată cu generarea de bioluminiscenţă

1.5.5. Alte reacţii fenotipice

Datorită unor limitări ale tehnologiilor existente actual, se înregistrează o creştere a necesităţilor pentru observaţii în timp real, fără compuşi marcanţi ai proteinelor şi celulelor în condiţii naturale (neperturbate). Un dezavantaj major al tehnologiilor actuale este necesitatea marcării şi supraexpresiei proteinei de interes. Datorită supraexpresiei şi modificării, activitatea biochimică a proteinei şi localizarea sa pot să nu reflecte condiţiile naturale (neperturbate) şi de aceea rezultatele trebuie interpretate cu precauţie. O tehnologie care se adresează acestei probleme utilizează unde de radiofrecvenţă [Hefti, Kumar, 1999] pentru a proba statusul fiziologic al unei proteine în contextul celulei că întreg. MCS utilizează microunde, care corespund frecvenţei naturale a dinamicii proteice, permiţând măsurarea proprietăţilor electrodinamice ale proteinelor şi celulelor. MCS nu permite utilizarea niciunor

adaosuri sau markeri şi poate fi realizată în orice mediu, de la soluții apoase simple la mixturi foarte complexe (celule), permițând o abordare directă pentru determinarea modificărilor în fenotipul celular (diferențiere).

Proteinele izolate în soluții tampon fiziologice expuse la o serie de frecvențe ale microundelor, demonstrează două proprietăți: răspunsul spectral („semnătura" proteinelor) şi profilul biofizic. Prima proprietate determină un răspuns natural al fiecarei proteine într-un interval de frecvențe. Profilul biofizic descrie modul în care o proteină interacționează cu mediul – volumul molecular, complexarea cu apa, interacțiunea cu alți compuşi/proteine – precum şi modul în care se compară cu alte proteine aparținând unor clase similare. Prin scanarea unui interval de frecvențe şi evaluarea diferitelor medii (condițiile de tamponare, prezența cofactorilor), această analiză defineşte o "semnătură" multidimensională pentru fiecare proteină chiar şi în medii complexe (celulare). Aceasta ar putea permite dezvoltarea unor reacții "cell-based" prin care profilul biofizic al proteinelor țintă să poată fi analizat într-un mediu care mimează situația din țesuturile primare afectate de boală.

CAPITOLUL 2

IMPLICAREA GENELOR KNOCKOUT ÎN ÎNȚELEGEREA MECANISMELOR BOLII ŞI DEZVOLTAREA UNOR NOI STRATEGII TERAPEUTICE

2.1. Introducere

Lezarea genelor țintă la şoareci reprezintă a nouă tehnologie care revoluționează cercetarea biomedicală, constituind un puternic instrument pentru producerea modelelor animale pentru studiul dezvoltării umane şi a bolilor ereditare. Chiar dacă proiectul genomului uman a ajutat la stabilirea celor aproximativ 35000 de gene candidate, doar o mică parte din aceste gene au fost caracterizate precis pentru funcția lor *in vivo*.

Genele țintă au un mare impact în încercările de a elucida rolul funcțional al acestor gene. Beneficiul major al acestei tehnologii este acela de a permite analiza funcției proteinei produsă de o anumită genă *in vivo*. Astfel funcția genei poate fi determinată în toate tipurile de celule normale, luând în considerare şi interacțiunile complexe între molecule sau celule. Este astfel posibilă determinarea produsului genei în condiții de repaus al corpului, dar şi în diferite situații patologice şi fiziologice.

Multe modele de gene knockout la şoareci simulează fenotipul bolilor umane. Modelele de şoareci modificate genetic reprezintă oportunități unice pentru dezvoltarea şi testarea diferitelor strategii terapeutice înainte ca acestea să fie introduse în clinică.

În viitor, ingineria genetică pe modele animale va fi indispensabilă pentru realizarea unor descoperiri importante în ceea ce priveşte mecanismele moleculare care stau la baza semnalizării celulare, dezvoltării, dar şi a patogenezei, diagnosticului, prevenirii şi tratamentul bolilor.

2.2. Gene knockout la şoareci

Modelele animale sunt deosebit importante pentru cercetarea biomedicală deoarece ajută la întelegerea patogenezei bolilor şi permit dezvoltarea de strategii terapeutice care să permită studiul eficacității noilor tratamente cu consecințe asupra costului şi timpului alocat trialurilor clinice [Malakoff, 2000; Smithies, 1993]. În unele cazuri, lipsa de modele animale a împiedicat progresul în direcția dezvoltării de terapii eficiente pentru bolile genetice. Şoarecii de laborator au devenit rapid cele mai utilizate mamifere în biomedicină datorită dimensiunilor reduse, ciclului de reproducere scurt, informației lor genetice cunoscute şi mai ales datorită posibilității de a induce modificări genetice precise în celulele stem embrionare şi de a le transfera la linii de şoareci. Prin urmare manipularea genetică a şoarecilor este actualmente larg răspândită, şoarecii fiind utilizați ca modele animale ce ne ajută să înțelegem dezvoltarea, prevenirea şi tratamentul bolilor. Multe alte specii ca Drosophila [Gloor, 2001], viermele nematod Caenorhabditis elegans [Jorgensen, Mango, 2002] şi peştele zebră [Udvadia, Linney, 2003] au fost utilizați în experimente de mutageneză pentru studiul proceselor de dezvoltare şi transducție a semnalelor.

Dintre mamifere şoarecii s-au dovedit a fi cele mai bune modele animale, deoarece ei sunt capabili să mimeze fenotipic bolile şi afecțiunile umane. Motivul pentru generarea de gene knockout la şoareci purtători de gene inactivate sau mutante, este de cele mai multe ori bazat pe supoziții sau necunoaşterea funcțiilor proteinei codificate de gena candidată, modelului ei de expresie, studiilor farmacologice sau a locilor cromozomiali implicați, în cohortele de pacienți din cadrul studiului. În urma publicării schiței genomului uman, mulți cercetători au adoptat strategii pe şoareci knockout pentru a contura, *in vivo*, funcțiile genelor de interes şi implicarea lor fiziopatologică în producerea bolilor. Procesul de dezvoltare a şoarecilor knockout cu o genă modificată începe de la ADN-ul genei. Dacă secvența de nucleotide a genei sau un fragment mare din genă este necunoscut, nu se poate realiza designul vectorilor țintă. ADN-ul celor mai mulți şoareci poate fi obținut din bazele de date ce conțin bioinformații despre ADNul din genomul şoarecilor, proiect care a fost

completat cu succes în 2002 [Blake JA şi colab., 2003]. Informațiile despre ADN-ul genelor permit construirea de vectori țintă care oferă posibilitatea de manipulare a genomului celulelor stem embrionare şi de inducție a unor alterări în gena de interes.

2.2.1. Celulele stem embrionare

În anii 60 după ce primele experimente de deleție genică au fost efectuate în celulele stem embrionare (ES) ale murinelor [Thomas şi colab., 1987], s-a obținut un număr remarcabil de şoareci knockout. O condiție obligatorie pentru realizarea acestui obiectiv a fost posibilitatea de obținere a murinelor. Celulele embrionare au caracteristici ce le face uşor de cultivat. Celulele ES sunt linii de culturi celulare, colectate inițial din masa celulară internă a blastociştilor la 3,5 zile postcoitus la stadiul blastulă de dezvoltare (fig. 2.1.).

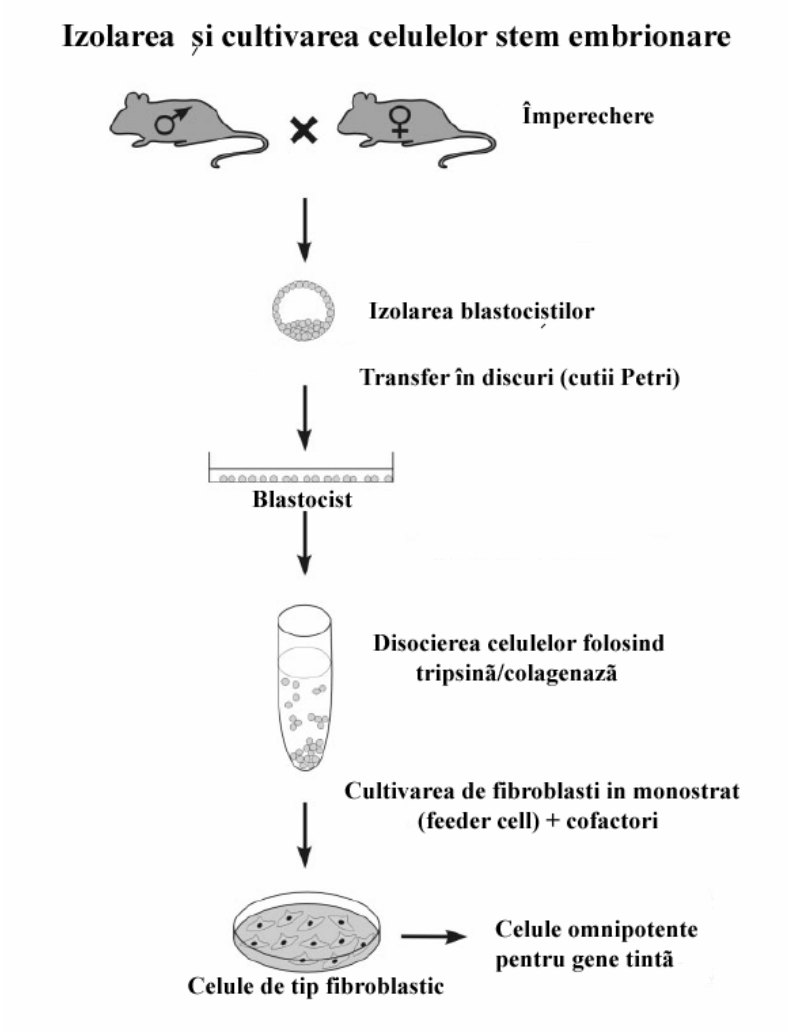


Figura 2.1. Diagrama izolării şi multiplicării celulelor stem embrionare

Deoarece aceste celule provin din stadii timpurii ale dezvoltării ele sunt celule pluripotente. Toate genele lor pot fi activate şi toţi produşii lor genici pot fi sintetizaţi. De asemenea ES pot fi subcultivate cu o eficienţă rezonabilă, permiţând ca un număr crescut de celule să fie folosite în procese ca transfecţia şi recombinarea secvenţelor omooage. În plus, celulele ES ale şoarecilor pot fi menţinute într-un stadiu nediferenţiat, în monostraturi de tip fibroblastic şi când mediul de cultură este îmbogăţit cu factor inhibitor leucemic.

În ciuda acestui tratament, celulele ES păstrează capacitatea lor de a contribui la toate tipurile de ţesuturi şi toate liniile celulare când sunt reintroduse într-un blastocist gazdă [Nagy, şi colab., 1993].

2.2.2. Vectori ţintă

Pentru a stabili modelul de şoarece knockout, este realizată o construcţie de ADN, numit vector ţintă ce conţine forma mutantă a genei de interes (fig. 2.2). Iniţial, primii vectori ţintă utilizaţi pentru a leza funcţia genei ţintă prin deleţia de secvenţe specifice şi înlocuirea lor cu ADN heterolog, erau o genă de selecţie pentru medicamente sau o genă marker pentru analiza expresiei genei ţintă [Zhang şi colab., 1994].Cum este arătat în figura 2.2 vectorul ţintă cuprinde trei elemente principale ordonate specific: i) o regiune 5' omoloagă genei ţintă, ii) o genă marker de rezistenţă la medicamente pentru selecţia pozitivă a celulelor care integrează vectorul ţintă, iii) o regiune 3' omoloagă genei ţintă.

Secvenţele ADN de la nivelul regiunilor 3' şi 5' din vectorul ţintă reprezintă substratul pentru crossing-overul reciproc sau pentru mecanismul de conversie genică care trasferă caseta marker de selecţie în locusul endogen. Secvenţele omoloage provin din fragmente genomice clonate ale genei ţintă şi delimitează sevenţele genei ţintă, care sunt înlocuite de caseta marker de selecţie pentru a genera locusul mutant. Pentru a deveni ţintă ADNul genomic izogenic trebuie utilizat împreună cu cel al celulelor ES în vederea construirii ţintelor. Specificitatea şi lungimea secvenţei ADN care delimitează regiunea ţintă poate fi maximalizată pentru o recombinare omoloagă eficientă, ce presupune de exemplu înlăturarea secvenţelor

repetitive. Când construcția a fost completă, vectorul este liniarizat la sfârşitul regiunilor omoloage 5' sau 3', astfel încât capetele ADN-ului să poată servi ca substrat pentru inițierea recombinării omoloage cu locusul țintă.

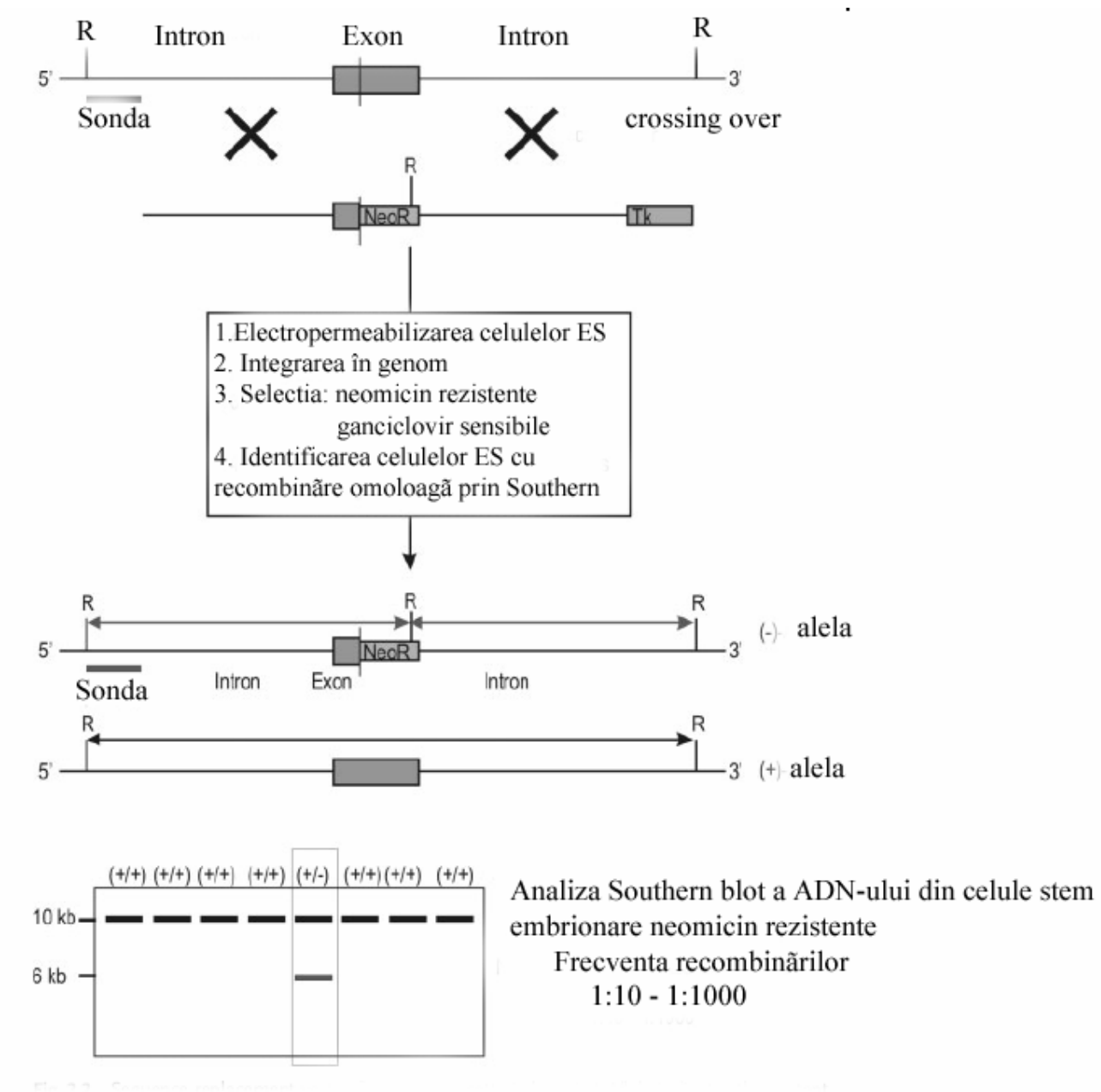


Figura 2.2. Secvența de înlocuire a vectorului pentru selecția pozitivă-negativă în celulele ES. Vectorul conține caseta de expresie a genei de rezistență Neo şi gena HSV Tk. După recombinarea omoloagă caseta de selecție pozitivă la medicament este încorporată în locusul țintă şi caseta de selecție negativă este înlăturată. Alela (-) indică alela mutantă după recombinarea omoloagă. R indică situsurile enzimei de restricție utilizate pentru excizia ADN înainte de detecția recombinării omoloage prin tehnica Southern blot cu ajutorul unei sonde specifice derivată din afara regiunii țintă.

După transfecția vectorului țintă liniarizat în celule ES, se face o selecție a medicamentelor, pentru a îmbogăți aceste celule ES, care s-au integrat în vectorul țintă şi se exprimă ca gene sensibile la medicament. Caseta de exprimare a genei marker include toate secvențele, de reglare necesare pentru transcriere. Cei mai frecvent utilizați markeri de selecție au fost gena neomicin fosfotransferaza (Neo), care conferă rezistență la analogul de neomicină G418. Metoda utilizată pe scară largă pentru a îmbogăți clonele de celule ES pentru recombinare omoloagă este o strategie a genelor țintă care implică un vector conceput pentru a fi utilizat într-o dublă selecție de droguri, protocol cunoscut ca selecție pozitivă-negativă (fig. 2.2). În afară de selecția pozitivă a markerului Neo poziționat între regiunile 5 şi 3 omoloage ale genei țintă, este inclusă o genă casetă suplimentară de selecție negativă amplasată la capătul regiunilor omoloage. Gena de selecție negativă cel mai frecvent folosită este gena caseta de expresie a virusului herpes simplex timidin kinaza (Tk), care conferă sensibilitate la guanozin analog al ganciclovirului. Produsul genei Tk fosforilează ganciclovirul, şi îi permite acestuia să fie încorporat în ADN-ul replicat acționând ca un inhibitor de sinteză al ADN-ului (fig. 2.3).

Într-un experiment tipic de gene-țintă, vectorul de selecție pozitivă/negativă va fi aleatoriu integrat de către capetele liniare în genomul multor celule, care păstrează ambele casete de selecție Neo şi Tk şi conferă rezistență la neomicină şi sensibilitate pentru ganciclovir. Totuşi, în cazul în care în celule ES a apărut recombinarea omoloagă între vectorul țintă şi gena omoloagă, caseta Neo-CAS va fi integrată în locusul țintă în timp ce caseta Tk se pierde şi aceste celule vor supraviețui fiind pozitive, dar şi sensibile la ganciclovir .

Prin folosirea schemei de selecție pozitivă/negativă, numărul absolut al coloniilor de celule ES care supraviețuiesc selecției duble de medicamente este de aproximativ 10 ori mai mic decât numărul de colonii care supraviețuiesc doar selecției pozitive.

Reducerea numărului de colonii fiind un screening pentru evenimentele genei țintă. Empiric, nu toate clonele de ES care supraviețuiesc selecției pozitivă/ negativă sunt recunoscute ca prezentând recombinări omoloage ce vor fi evidențiate prin

tehnica Southern blot care utilizează sonde specifice pentru locusul țintă în celulele ES (fig. 2.2), motiv pentru care acestea, ar putea conține gena marker de selecție negativă care dobândeşte mutații de inactivare, înainte de integrarea aleatorie a vectorului țintă în genomul celulei ES.

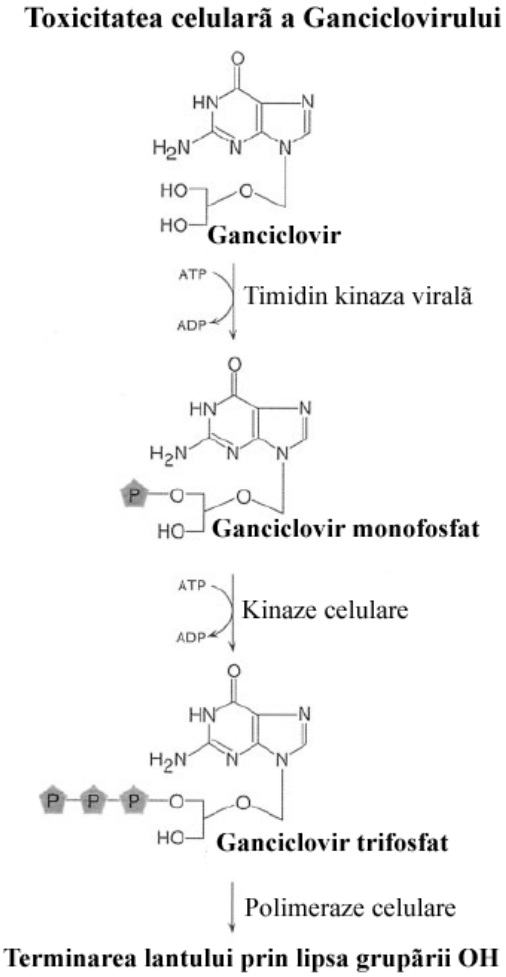


Figura 2.3. Mecanismul toxicității celulare a ganciclovirului utilizat pentru selecția negativă în screening-ul celulelor stem embrionare cu recombinare omoloagă.

2.2.3. Selectarea celulelor stem embrionare recombinate

Vectorul țintă liniar este introdus în celulele stem embrionare prin amestecare cu prealabilă cu aceste celule într-o cuvetă de electropermebilizare, anterior construirii unui câmp electric. Câmpul electric deschide porii membranei celulelor ES, permițând intrarea vectorului țintă. Când curentul electric este întrerupt , membrana celulelor ES revine la situația normală.

Secvența ADN construită difuzează prin citoplasmă şi intră în nucleu. Toate celulele ES care au suferit electropermeabilizare sunt crescute în culturi celulare care conțin soluție de antibiotic. După transfecție, recombinarea omoloagă dintre vectorul țintă şi locusul endogen din celulele ES este rară, iar prezența de gene marker pentru selectarea medicamentelor permite îmbunătățirea recuperării celulelor ES recombinate. Coloniile de celule ES crescute vizibil şi dezvoltate în prezența unor compuşi de selecție sunt recoltate ca şi candidate probabile ce pot să conțină gene mutante în genomul lor.

Celulele ES care au suferit recombinari omoloage vor fi genetic heterozigote, la nivelul locilor cromozomiali vizați. Astfel, în planificarea oricărui experiment cu gene țintă, este important să avem o strategie de genotipare, strategie care va face uşor discriminări între tipul sălbatic (wild type) şi locii mutanți din celulele cu evenimente de recombinare omoloagă. La selectarea regiunilor omoloage din gena țintă pentru clonare în vectorul țintă, este important de a se anticipa utilizarea analizei Southern blot (sau analiza PCR), considerând disponibile situsurile enzimei de restricție pentru a genera fragmente de diagnostic.

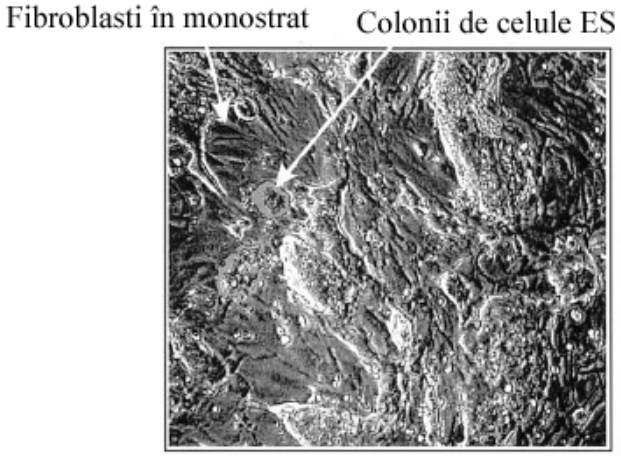
Succesul acestor analize este dependent de selecția sondelor ADN din afara regiunilor de recombinare şi de alegerea situsurilor de restricție care vor conduce la identificarea fragmentelor de restricție care sunt unice pentru alelele mutante şi respectiv alelele de tip sălbatic (fig. 2.2).

2.2.4. Injectarea celulelor ES recombinate în blastocişti şi transferul blastocistului la primitori pseudoînsărcinați

Coloniile de celule ES ce prezintă recombinările omoloage presupuse sunt individualizate prin tripsinizare şi colectate cu un ac fin, subțire care este conectat la un micromanipulator. Blastociştii destinați microinjectării cu celule ES sunt prelevați de la femele donatoare. Cu un ac ascuțit se penetrează brusc şi precis blastocistul şi se eliberează 15-25 celule ES, prin presiune pozitivă. Embrionii injectați trebuie implantați la femele. Succesul de transfer al embrionilor depinde de calitatea mediului gazdei materne. Împerecherea cu şoareci masculi este necesară pentru

modificările hormonale necesare stabilirii sarcinii. Femelele nu pot purta embrionii lor adevărați şi sunt puse să se împerecheze cu şoareci vasectomizați.

Femelele de şoareci au ovulație spontană şi pot fi fals însărcinate prin împerecherea cu masculi vasectomizați în timpul estrului, ele vor afişa profilul hormonal al unei femele gravide normal.



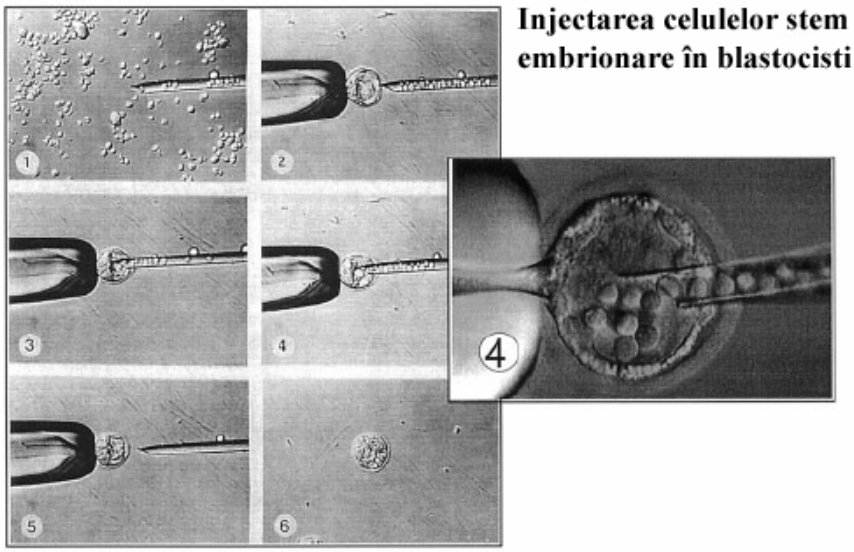


Figura 2.4.

Figura de sus. Clone celulare multiple de celule stem embrionare ce cresc formând monostraturi de fibroblaşti. Fibroblaştii provin de la embrioni de şoareci transgenici purtători ai casetei de selecție Neo, conferind rezistență la geneticină pentru selecția pozitivă. Fibroblaştii sunt iradiați pentru a preveni proliferarea lor ulterioară, după pregătirea acestora din embrioni,

Figura de jos. Injectarea celulelor ES în blastocist. Celule ES individualizate sunt încărcate într-o pipetă de injectare. (1), vârful ascuțit al pipetei pătrunde în cavitatea blastocistului (2) cu grijă şi încet se împinge vârful de injecție al pipetei în embrion fără ruperea sau înțeparea peretelui opus(3), celulele ES sunt expulzate prin presiune pozitivă, (4), acul este retras din embrion (5), şi blastociştii injectați sunt colectați pentru transferul la femele recipient(surogat) (6).

2.2.5. Himera şi puii F1 şi F2

Succesul microinjectării celulelor stem embrionare în blastocist duce la formarea unui embrion care conține celule din blastocistul inițial şi în plus celulele embrionare implantate în blastocist. Celulele de origini diferite cresc împreună pentru a forma un nou embrion. Şoarecele hibrid rezultat are țesuturile şi organele formate dintr-un amestec de celule derivate din celulele de origine (de obicei cu provenienţă din şoareci C57/BL6 cu blana neagră) şi celule ES (de obicei cu provenienţă din şoareci SV129 cu blana galben/maronie). Hibridul este denumit himeră pentru că acesta conține celule din două surse independente. Blana hibrizilor himerici este un amestec de galben-maroniu şi negru. Dacă nici o celulă ES nu este încorporată în stadiul de blastocist, puii vor avea blana neagră. Aspectul blănii este un marker precoce util pentru succesul unei mutații. Şoarecii himeră sunt identificați odată ce culoarea blănii devine detectabilă. Când încorporarea celulelor mutante este numai la nivelul celulelor somatice, care se dezvoltă în țesuturi nonreproductive, himerele vor exprima mutația, dar puii lor nu. Când încorporarea are loc în celule care se dezvoltă din celulele germinale mutația țintă este transmisă la generația următoarea de pui de himeră (fig.2.5).

Pentru a detecta trasmiterea pe linie germinală se realizează încrucişarea între himeră şi şoareci de tip sălbatic. Himera este încrucişată cu rase de şoareci normali, ca C57/BL6. Puii F1, rezultat al încrucişării, sunt analizați pentru exprimarea mutației (fig. 2.5). Un pui de şoarece F1 care primeşte gena mutantă de la progenitorul himeric este heterozigot pentru gena mutantă. Tehnica Southern blot şi tehnica PCR cu sonde specifice se efectuează pe ADN-ul genomic dintr-un mic eşantion de țesut de la coada puiului de şoarece, în scopul identificarii heterozigoților pozitivi. Fiecare heterozigot pozitiv este un potențial fondator pentru o linie de şoareci mutanți.

Puii heterozigoți F1 identificați sunt împerecheați unul cu celălalt pentru a produce o generație F2. Teoretic, populația F2 va urma principiile de segregare mendeliană, rezultatul fiind 25% homozigoți mutanți, 25% homozigoți control tipul sălbatic şi 50% heterozigoți mutanți. În cazul în care deleția genei este letală, homozigoții mutanți nu vor supraviețui.

În cele din urmă, lipsa produsului genei la homozigoții mutanți este evidențiată prin anticorpi specifici prin tehnica Western blot folosind țesut unde proteina este, de obicei, exprimată.

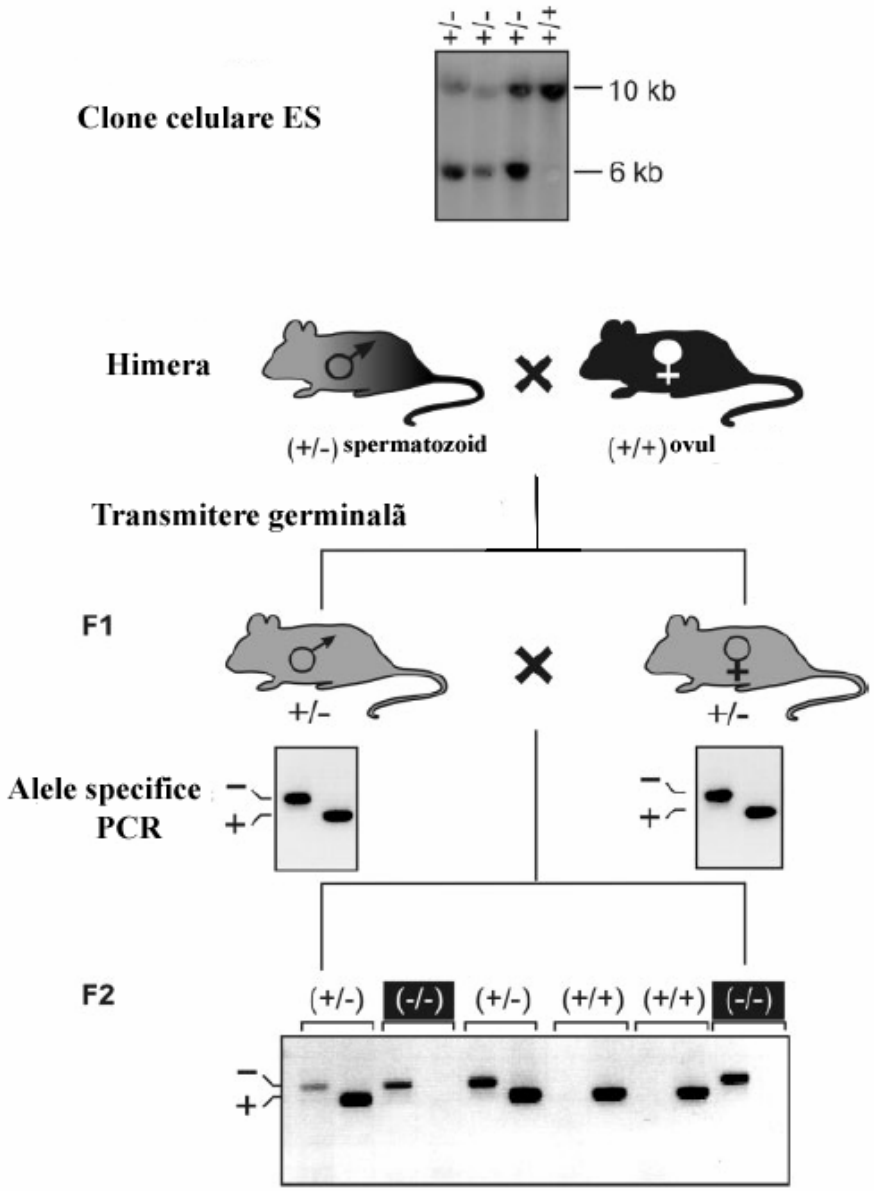


Figura 2.5. Împerecherea şoarecilor himeră, cu şoareci de tip sălbatic(wild type) pentru obținerea de heterozigoți mutanți. Clonele de celule stem embrionare putătoare a unei alele de tip sălbatic şi unei alele mutante (+/-) sunt injectate în blastocişti.Se observă analiza Southern blot caracteristică pentru clonele de celule ES. Blastociştii injectați sunt transferați la femele recipient care vor da naştere la himere. De obicei celulele ES purtătoare de mutații dominante care determină culoarea maroniu-gălbuie a blănii (rasa SV129), sunt injectate la blastocişti de la şoareci de rasă neagră (rasa C57B16). Prin urmare, gradul de hibridizare poate fi uşor recunoscut prin contribuția culorii maroniu/gălbuie la culoarea blănii. Himerele sunt apoi, împerecheate cu şoareci C57B16 de culoare neagră. În cazul transmiterii mutației pe linie germinală, şoarecii heterozigoți F1 (+/-) vor fi cu blana maroniu-gălbuie.Ca urmare a împerecherii şoarecilor heterozigoți între ei, un sfert din şoareci vor fi homozigoți F2, dacă viabilitatea nu este compromisă de mutații.

Se generează apoi o linie de şoareci cu gena mutantă. Şoarecii homozigoţi cu mutaţie nulă au deficiente ambele alele, iar heterozigoţii au deficientă doar una din cele două alele ale genei. Genotipul este -/- pentru mutaţie nulă, +/-pentru heterozigoţi şi +/+ pentru alela de tip sălbatic obişnuită, de control (wild-type). Fenotipul reprezintă setul de caracteristici determinate de mutaţie şi se referă la caracteristici biochimice, anatomice, fiziologice şi comportamentale.

Caracteristicile şoarecilor mutanţi sunt identificate, în comparaţie cu şoarecii de control normali, iar cele relevante pentru bolile umane sunt cuantificate. Aceste caracteristici specifice bolii sunt apoi folosite ca variabile de test pentru evaluarea eficienţei tratamentelor. Tratamente general acceptate sunt administrate la şoarecii mutanţi. Un tratament care previne sau înlătură caracteristicele bolii la şoarecii mutanţi este folosit pentru mai multe teste suplimentare ca un tratament potenţial terapeutic pentru boli genetice umane.

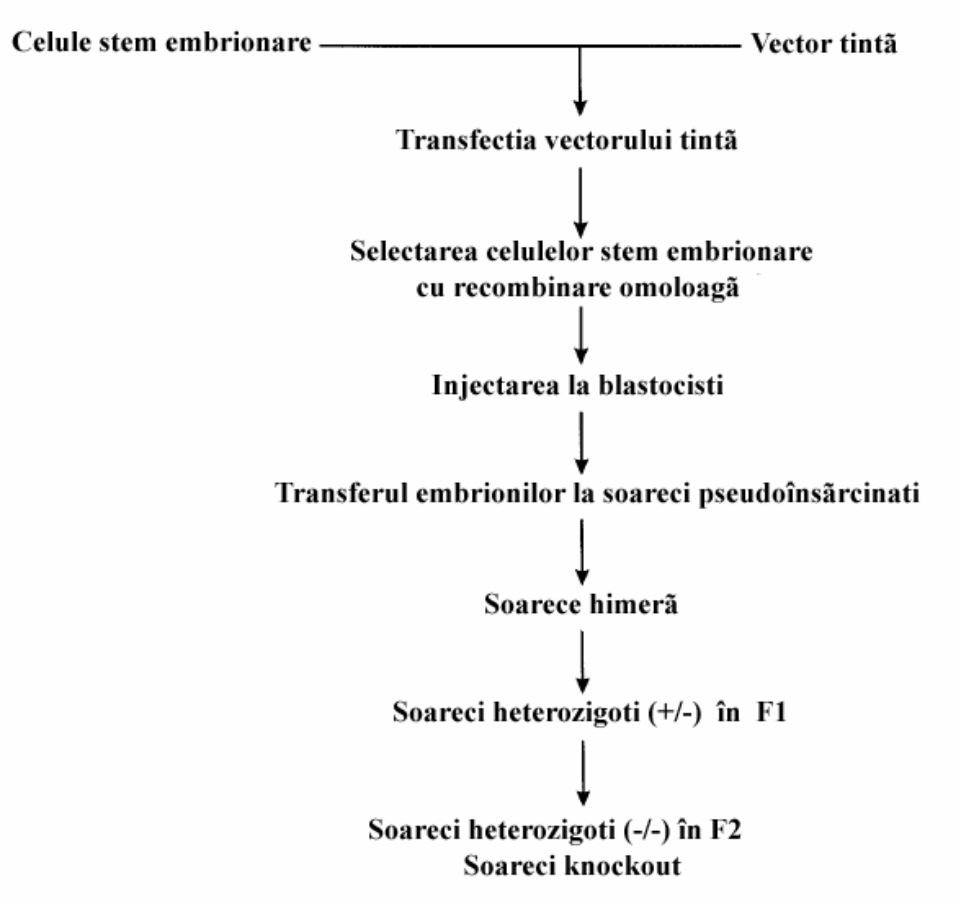


Figura 2.6. Diagrama fluxului pentru genele knockout

2.3. Expresia genelor țesut specifice

Tehnologia convențională de gene knockout este limitată de moartea embrionară sau postnatală imediată întrucât rolul unor astfel de gene nu poate fi investigat. În plus, rolul unei anumite gene în țesuturile adulte poate fi mascat la orice şoareci knockout, generați prin anomalii sau compensări de dezvoltare, sub forma intensificării sau atenuării expresiei altor gene. Implementarea de situsuri specifice de recombinare, cum ar fi sistemul bacteriofag P1 LoxP / CRE, permit dezvoltarea unui knockout condiționat de absența unei anumite gene numai într-un țesut specific sau după un stadiu de dezvoltare specific [Gu şi colab., 1993]. Enzima CRE este izolată de la bacteriofagul P1 şi acționează ca un situs specific de recombinare. Secvența recombinată de către CRE, denumită LoxP, constă din două scurte repetiții de ADN (situsul de recunoaştere CRE) şi o secvență intermediară, între cele două. Două secvențe LoxP cu aceeaşi orientare vor conduce la excizia ADN-ului cuprins între cele 2 secvențe de către CRE lăsând intact un situs LoxP (fig. 2.7). În contrast, în cazul în care două situsuri LoxP sunt orientate opus, CRE va inversa acest segment intermediar de ADN.

Construcțiile țintă pentru inserția situsurilor LoxP în ADN-ul genomic sunt similare cu cele utilizate pentru realizarea de gene knockout convențional în celule ES (fig. 2.2). În plus față de aceste aspecte, design-ul construcției de gene knockout condiționat necesită un număr important de considerente suplimentare: knockoutul convențional este, de obicei, conceput astfel încât caseta Neo lezează transcrierea genei endogene. În knockout-ul condiționat, gena endogenă trebuie să funcționeze în mod normal, până la recombinarea de către CRE recombinaza şi, astfel, orice modificări trebuie să fie în afara regiunilor de codificare, adică introni, şi nu trebuie să interfereze cu regiunile de reglare (fig. 2.7). Situsul LoxP trebuie să fie introdus într-un mod în care splicing-ul, va avea ca rezultat excizia unei cantități suficiente de ADN pentru ca gena să fie inactivată. Acest lucru poate fi deosebit de dificil pentru genele cu introni de dimensiuni mari, în cazul în care numai cantități mici de secvențe codificatoare pot fi înlăturate.

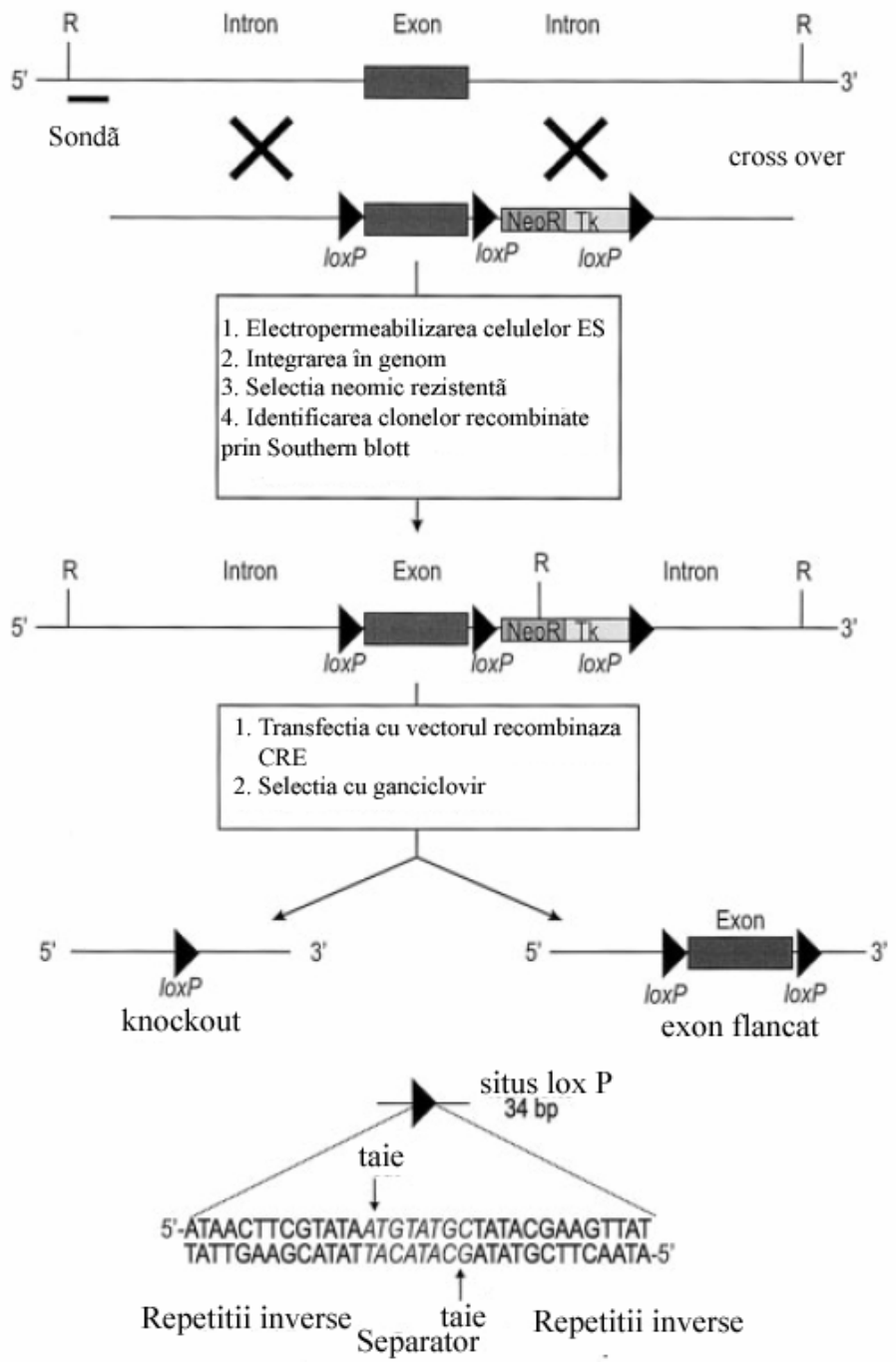


Figura 2.7. **Knockout condiţional utilizând LoxP/ CRE**. Locusul de tip sălbatic şi construcţia ţintă condiţională prezintă trei situsuri LoxP ce flanchează caseta marker de selecţie a tandemului Neo/Tk şi exonul care va fi deletat. O prima ţintă este recombinarea dintre această construcţie şi locusul ales. O clonă recombinată pozitiv este aleasă pentru a doua fază , ce cuprinde trasfecţia cu vectorul ADNc - recombinaza CRE . După expunerea la CRE sunt posibile 3 evenimente recombinatorii. Populaţia celulară A prezintă excizia completă şi poate fi utilizată pentru injectarea blastociştilor pentru a genera knockout total la şoareci. Populaţia de celule B este forma în care caseta de selecţie a fost eliminată, dar gena nu este încă deletată. Aceste celule ES sunt preluate pentru a stabili knockoutul condiţional, unde exonul flancat este deletat mai târziu, adică după încrucişarea animalelor rezultate cu şoareci transgenici ce exprimă recombinaza CRE sub un promotor ţesut specific. Secvenţa palindromică parţială de nucleotide a situsurilor LoxP este prezentată în partea inferioară.

Astfel, situsurile LoxP trebuie să fie poziționate pentru a înlătura exonii care codifică un important domeniu funcțional şi ca rezultat ar avea loc schimbarea cadrului de citire. Genele de rezistență incluse pentru selecția clonelor țintă conțin de obicei mai multe kilobaze de ADN străin, care are potențialul de a influența expresia genei țintă înainte de recombinare. Pentru a minimaliza această potențială influență asupra expresiei genei, este posibil să se înlăture gena de rezistență din clonele celulelor ES țintă *in vitro*, înainte de microinjectarea blastociştilor. Pentru a elimina genele de rezistență, un situs suplimentar LoxP trebuie să fie inclus pentru a flanca gena de rezistență (fig. 2.7). ADN-ul genomic modificat ar include, astfel, trei situsuri LoxP, două poziționate pe flancuri, însoțind gena de rezistență, precum şi cel de-al treilea situs situat pentru producerea deleției dorite, atunci când apar recombinari. Transfecția clonelor celulare țintă de celule ES cu un vector care conține ADNc al recombinazei CRE produce celule ES cu trei configurații genomice alternative în plus față de clonele non-recombinate (fig. 2.7).

Pentru a limita numărul evenimentelor de recombinare şi pentru a facilita selecția dorită de clone, o selecție negativă poate fi realizată prin adăugarea ganciclovirului în celule ES. Această strategie necesită utilizarea unei casete marker de selecție care conține atât gena Tk cât şi gena Neo de rezistență pentru selecție. Adaosul de ganciclovir în culturile celulare de ES va permite creşterea clonelor cu : i) exonul de interes flancat de două situsuri LoxP, şi anume exonul delimitat pentru knockout-ul condiționat şi ii) clonele de celule ES cu un singur situs LoxP, gata de utilizare pentru stabilirea knockout-ului general. Astfel, folosind trei site-uri LoxP şi caseta marker de selecție Neo/Tk introduse în genomul celulei ES se produc ambele tipuri de clone clasice pentru: knockout-ul general şi knockout-ul condiționat. Selecția clonelor în care gena de rezistența a fost deletată şi ADN-ul genomic, cu modificări adecvate, a fost lăsat intact, poate fi realizată prin screening folosind tehnica Southern blot. Când injectarea blastociştilor şi transmiterea pe linie germinală a celulelor ES cu knockout condiționat este realizată şi şoareci cu exonul flancat au fost obținuți, recombinaza CRE este exprimată în țesutul sau tipul celular de interes (fig. 2.8). Recombinaza înlătură specific exonul fundamental din alela

modificată şi creează o excizie CRE knockout dependentă. Pentru a realiza acest lucru, o linie CRE transgenică care exprimă recombinaza sub un promotor celular sau țesut specific este încrucişată cu şoareci knockout condiționat cu exonul flancat. Numai în celulele unde recombinaza CRE este exprimată, are loc excizia exonului, rezultând o deleție a genei țesut specifică. Între timp, linii de şoareci CRE transgenici sunt disponibili, fiecare exprimând recombinaza cu specific diferit. Astfel, sistemul de recombinare LoxP/CRE este un instrument puternic pentru deleția condiționată şi specific celulară a genelor. Introducerea acestui sistem la şoarecii transgenici facilitează studiile cu privire la pierderea funcției genelor într-un anumit tip de celule. Prin inserția situsurilor Lox pe calea recombinarii omoloage în gena de interes şi expresia recombinazei CRE țintă pentru un anumit tip de celule folosind un promotor țesut specific, va fi posibilă introducerea delețiilor predeterminate în genomul mamiferelor.

2.3.1. Recombinaza CRE ligand activatoare

În ultimii ani, au fost dezvoltate tehnologii, care permit noi abordări în scopul de a controla temporal şi țesut specific mutația dorită pentru expresia genelor inductibile la şoareci transgenici şi care pot fi combinate cu mai multe gene țintă convenționale. De exemplu, o metodă pentru genele țintă condiționate este bazată pe supraexpimarea recombinazei CRE care ar putea permite inactivarea genei țintă flancată, țesut-specific, în orice moment din timpul dezvoltării şi la şoarecele adult (fig. 2.8., figura de jos).

Fuziunea domeniului de legare la ligand (LBD) al receptorilor de estrogen cu recombinaza CRE generează o recombinază himerică a cărei activitate este dependentă de prezența receptorilor de estrogen sau de tamoxifen modulator al receptorilor de estrogen [Metzger , 2001]. Pentru a obține gene țintă condiționate la şoareci, în cazul în care estradiolul endogen este prezent, s-a indus fuziunea recombinazei CRE cu LBD mutant al receptorilor de estrogen uman. LBD mutant al receptorilor de estrogen nu este legat de estradiol, întrucât acesta se leagă de ligandul sintetic pentru tamoxifen.

S-au produs linii de şoareci transgenici ce exprimă recombinaza CRE fuzionată cu LBD mutant al receptorului de estrogen sub controlul unor promotori diferiţi ţesut specific (P) (fig. 2.8, figura de jos).

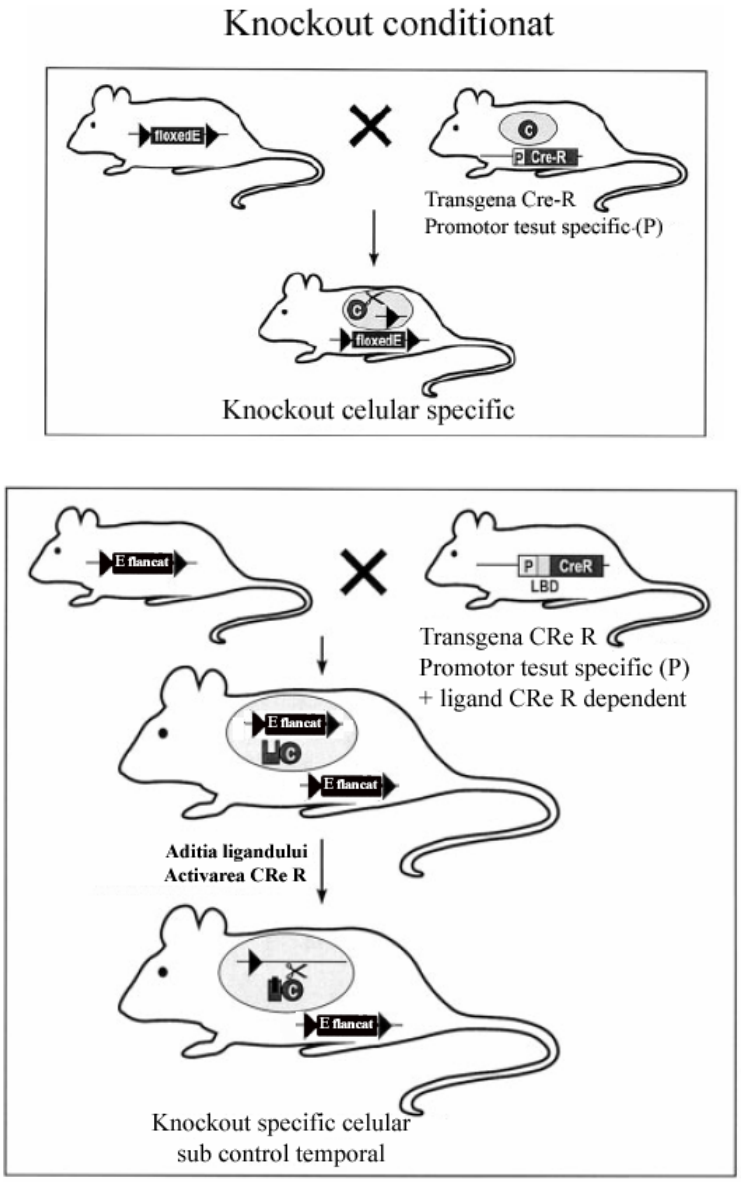


Figura. 2.8.

Figura de sus. **Strategie de reproducere pentru obţinerea unor şoareci cu knockout celular specific**. Şoarecii care prezintă alele nule , şi în plus sunt purtători ai alelei unde gena sau exonul care vor fi deletaţi sunt flancaţi de două situsuri LoxP (exoni flancaţi) sunt fenotipic şoareci heterozigoţi. Când sunt împerecheaţi cu şoareci transgenici care exprimă recombinaza CRE (C) sub un promotor ţesut specific aceşti şoareci devin homozigoţi mutanţi nuli în ceea ce priveşte acest ţesut.

Figura de jos. **Strategie de reproducere pentru obţinerea de şoareci cu knockout celular specific sub control temporal**. Transgena-recombinaza CRE fuzionează cu ADNc domeniului de legare al ligandului receptorului de estrogen. Activarea recombinazei CRE este dependentă de prezenţa tamoxifenului, care poate fi furnizat şoarecilor în apa potabilă. Adaosul de tamoxifen permite knockoutul genei sau exonului de interes oricând în punctul dorit.

Un astfel de şoarece transgenic poate fi împerecheat cu un şoarece ce prezintă un exon flancat în interiorul genei care ar trebui deletat. Puii lor exprimă ambele modificări, exonul flancat şi recombinaza CRE ligand dependentă, şi li se administrează tamoxifen. Exonul flancat este ulterior eliminat din genomul acestor ţesuturi, în cazul în care proteina recombinazei CRE de fuziune este exprimată.

Exprimarea celulară specifică a recombinazei CRE fuzionată la un receptor de estrogen LBD mutant, la şoarecii transgenici, poate fi astfel utilizată pentru eficientizarea recombinării CRE mediată de tamoxifen (tamoxifen dependentă), la nivelul locilor ce conțin situsuri LoxP pentru a genera mutații somatice situs specifice într-o manieră spațio-temporală controlată.

2.3.2. Expresia sistemului tetraciclin/ doxiciclin inductibil

Capacitatea de a controla expresia genei, şi în cele din urmă, a genei, țintă, la şoarecii transgenici prin simpla administrare de substanțe exogene oferă un nou nivel de de control asupra sistemului CRE / LoxP, pentru a induce mutații genice la şoareci. Sistemul ce răspunde la tetraciclină este compus dintr-o proteină tetraciclin represoare (TetR), fuzionată la un domeniu activator de transcriere pentru virusul herpes, precum şi o secvență tetraciclin operator (tetO) legate de un mic promotor pentru controlul transcripției unei gene ce intervine după legarea TetR de tetO [Gossen , 2002]. Vectorii de exprimare TetR şi promotorul minimal tetO ce dirijează transcripția genei în celulele de mamifere sunt disponibile în comerț.

Sistemul tetraciclin-responsiv poate fi folosit împreună cu tehnologia CRE/LoxP pentru a permite controlul temporal al genei țintă la şoareci, prin plasarea expresiei genei CRE sub controlul unui promotor minimal tetO. Pentru mai multă specificitate, un promotor țesut specific poate fi folosit pentru a regla expresia genei TetR. Mai mult decât atât, există variații Tet-off şi Tet-on pentru controlul expresiei genei tet responsive, care depind de legarea de tetraciclină a TetR.

În versiunea Tet-off a acestui sistem, proteina transactivatatoare TetR, tTA, se va lega la promotorul tetO minimal în prezența tetraciclinei pentru a represa expresia genei. Când administrarea de tetraciclină este oprită, tTA nu se mai leagă de de

promotorul tetO minimal şi transcrierea este indusă de mai multe mii de ori în ţesuturile şoarecilor transgenici. După cum este ilustrat (fig. 2.9), este necesar să se genereze două linii de şoareci care sunt homozigoţi pentru gena tTA şi heterozigoţi pentru locii mutanţi „de tip sandwich", şi homozigoţi pentru transgena CRE şi respectiv, heterozigoţi pentru pentru locii mutanţi „de tip sandwich". Prin reproducerea celor două linii de şoareci, 25% dintre pui vor fi homozigoţi pentru locusul mutant condiţional şi heterozigoţi atât pentru transgena tTA cât şi CRE.

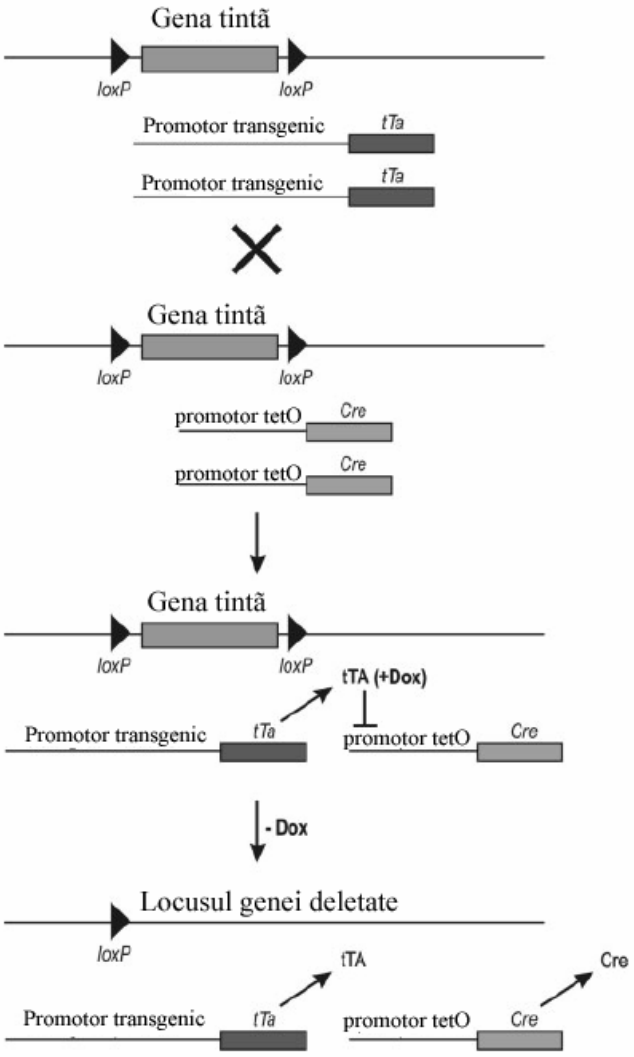


Fig. 2.9. Ţintele genei Tet-off inducibile.

Linie de şoareci heterozigoţi pentru un locus ţintă mutant condiţional cu situsurile LoxP flancând gena de interes şi linie de şoareci homozigoţi pentru transgena care exprimă proteina tetraciclin represoare. De asemenea, linia de şoareci este încrucişată cu alta care este heterozigotă pentru transgena CRE responsivă la tetraciclină. Încrucişarea acestor linii produce progenitori care sunt heterozigoţi pentru ambele transgene, pentru a menţine represia genei CRE şi care vor transmite locusul mutant condiţional şi locusul de tip sălbatic conform transmiterii mendeliene. Eliminarea doxicilinei are ca rezultat exprimarea genei CRE şi crearea unui locus ţintă mutant. Alela de tip sălbatic a locusului ţintă endogen nu este ilustrată.

Pentru a menține expresia genei CRE reprimată şi pentru a preveni recombinarea LoxP-mediată de la nivelul locilor țintă în timpul embriogenezei puilor, doxiciclina poate fi administrată în apa potabilă. La îndepărtarea doxiciclinei, expresia genei CRE este dezinhibată, şi determină recombinarea LoxP mediată, perturbând genele țintă. Ca dezavantaj al acestui sistem a fost raportată inconstanța, adică pierderi ale expresiei genei CRE în starea represată.

În versiunea Tet-On a acestui sistem, expresia genei CRE controlată de promotorul tetOminimal este mai degrabă indusă, decât represată, de administrarea doxiciclinelor (fig. 2.9). Astfel, rezultă o formă mutantă a TetR, rtTA, care în mod normal represează promotorul minimal tetO. După adăugarea de doxiciclină, rtTA este eliberat din tetO permițând exprimarea genei CRE. De asemenea, acestui sistem, ca revers celui descris mai înainte, îi lipseşte o reprimare mică a promtorului tetO minimal.

2.4. Şoareci transgenici

Având în vedere că şoarecii knockout au o genă cu deleție, şoarecii transgenici pot avea o nouă genă adăugată sau o extracopie a unei gene existente, în scopul de a investiga supraexpresia genei. Tehnicile transgenice încep cu dezvoltarea construcției genei de fuziune în care ADNul transgenic este dirijat de un promotor specific [Rossant, 1995]. ADN-ul transgenic construit este apoi microinjectat în pronucleii ovocitelor fecundate de şoarece, care au fost recoltate după tratamente hormonale, de la femele de şoareci la care a fost stimulată ovulația (fig. 2.10).

Celula ou este suficient de mare pentru a fi văzută la microscop. Prin procese de recombinare aleatorii, gena de fuziune construită se integrează în genom. În cazul în care transgena este integrată în genomul celulei înainte de prima diviziune, embrionii se dezvoltă cu gene străine conținute în fiecare celulă somatică şi germinală.

Ouăle microinjectate sunt transferate în oviductele femelei şoarece fals însărcinate, genetic normală. Şoarecele care se dezvoltă din fiecare ou microinjectat este fondator de linie mutantă. Probabil transgena se integrează în locații

cromozomiale diferite în genomul fiecarui şoarece fondator, care generează linii mutante. Utilizând promotori ţesut specifici, se încearcă definirea situsului de încorporare. ADN-ul modificat se introduce într-o locaţie cromozomială omoloagă cu ADN-ul promotorului. Transgena se introduce numai într-un cromozom. Astfel, embrionul, se dezvoltă ca heterozigot pentru transgenă. Heterozigoţii sunt apoi împerecheaţi unii cu alţii pentru a genera homozigoţi transgenici, heterozigoţi, şi de tip sălbatic (wildtype), după modelul transmiterii mendeliene. ADNul realizat conţine adesea o genă reporter controlată, de aceleaşi promotor, astfel că prezenţa genei reporter în celule indică prezenţa celulară a transgenei. Concentraţiile de genă reporter, de transgenă şi produs genic se analizează cantitativ pentru a determina supraexprimarea genei în ţesutul de interes. Cartografierea anatomică a localizării genei reporter, transgenei şi produsului genei este realizată pentru a descrie distribuţia anatomică a expresiei transgenei în perioada de dezvoltare a animalului.

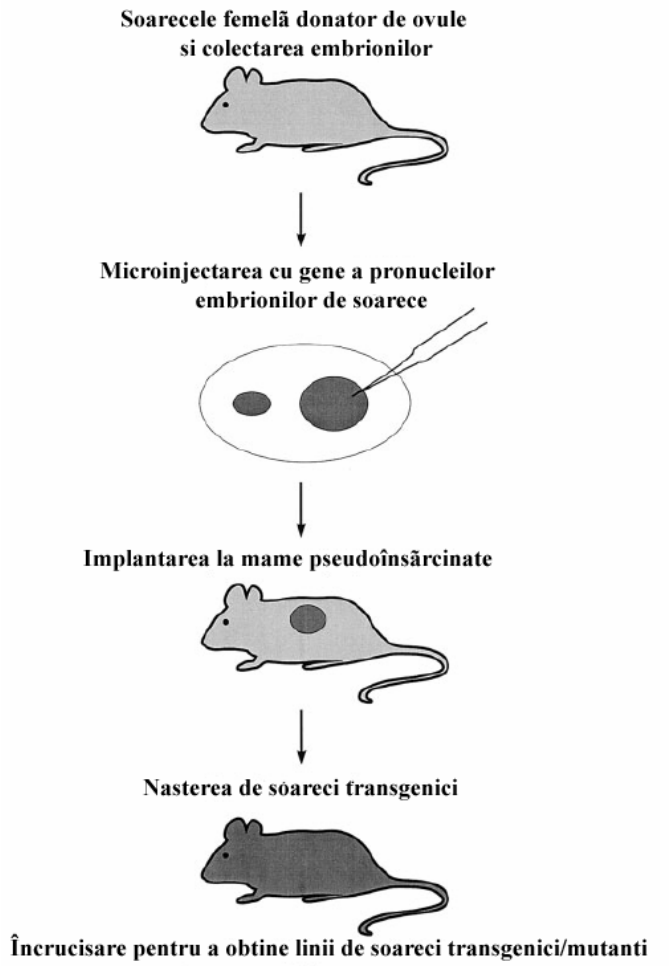


Figura. 2.10. Diagrama producerii şoarecilor transgenici

2.5. Lezarea genelor țintă la Drosophila

Completarea cartografierii secvențializării genomului [Adams , şi colab., 2000] oferă acces nelimitat la toate genele de *Drosophila melanogaster*. Cu toate acestea şi aproape după un secol de genetică pe Drosophila, există mai multe gene pentru care mutațiile corespondente nu sunt încă disponibile. Mijloacele pentru a depăşi aceste impedimente au fost situsurile selectate de traspozonii mutageni şi de interferență ARN-mediată. În timp ce transpozonii mutageni implică screeningul PCR complex, ARNi generează numai fenocopii specifice mutațiilor cu pierderea funcției şi nu provoacă întotdeauna un fenotip cu adevărat nul. Ca urmare, s-au dezvoltat metode de inducție a unor gene țintă knockout. Genele țintă în Drosophila sunt realizate prin tehnici elegante, care profită de recombinarea omoloagă endogenă germinală la aceste insecte zburătoare [Rong , şi colab., 2002]. Tehnica se aseamănă cu cea de knockout țintă în celulele ES la şoareci şi poate viza o mutație în orice locus din genomul Drosophilei.

Această metodă implică trei componente: i) o transgenă, care exprimă o recombinază de şoc termic situs specifică inductibilă, (recombinaza FLP din drojdia de bere), ii) o a doua transgenă, care exprimă o endonuclează de şoc termic inductibilă situs specifică (I-SceI), iii) un vector transgenic donator care poartă situsurile de recunoaştere pentru ambele enzime (două situsuri FRT de 18 de perechi de baze şi respectiv un situs I-SceI), în plus față de gena țintă de tip sălbatic, şi gena albă ca marker de selecție pozitivă (permite screeningul descendenților pentru ochi albi). Primul pas este introducerea aleatorie, a endonucleazei I-SceI inductibilă de şoc termic situs specifică şi a recombinazei FLP folosind un element de sistem P. Elementul P- este un element genetic mobil ce codifică o transponază care permite elementului P- inserarea în ADN. Vectorul donator (fig. 2.11) este, de asemenea, introdus în mod aleatoriu în genom prin transformarea mediată de elementul P. Pentru recombinare, musculițele purtătoare a ambelor transgene atât a I-SceI inductibilă de şoc termic cât şi a FLP sunt încrucişate cu musculițe care poartă gene care urmează să fie flancate țintit de situsurile de recunoaştere FRT. Prin şoc termic, recombinaza FLP situs specifică şi endonucleaza (I-SceI) situs specifică, excizează

apoi, *in vivo*, o moleculă de ADN extracromozomial purtătoare de rupturi dublu catenare recombinatorii în cadrul genei de interes. Prezența acestei rupturi dublu catenare (DSB) stimulează recombinarea omoloagă între donorul excizat şi locusul țintă omolog cromozomial (fig. 2.11). Câteva categorii de recombinare la nivelul locusului țintă incluzând substituțiile alelice şi inserția ADN-ului donor sunt observabile la gameții femelelor. În multe cazuri, produsul inserției este o duplicație în tandem parțială a genei țintă, cu ambele copii cu defecte, deoarece fiecare are un fragment lipsă a genei (fig. 2.11). Având în vedere că evenimentele de recombinare apar germinal, progenitorii sunt obținuți cu gena knockout țintă în afara fiecărei celule.

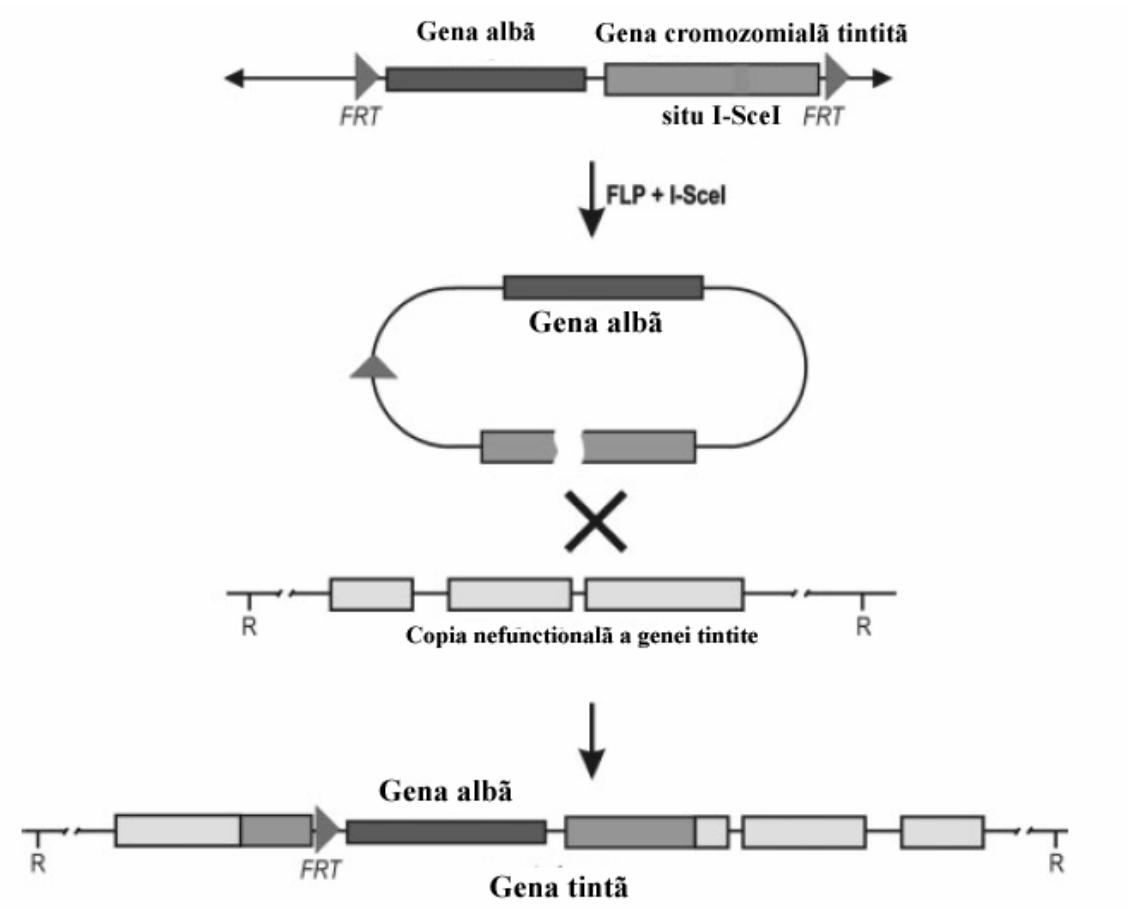


Figura 2.11. Gene țintă la Drosophila.

Vectorul țintă transgenic conține gena țintă într-o formă trunchiată cu un situs rar pentru endonucleaza I-SCE-I, împreună cu gena albă, pentru a permite selecția ochilor albi la Drosophila. Construcția este flancată de două situsuri FRT care sunt recunoscute de recombinaza FLP. Recombinaza FLP mediază excizia, iar endonucleaza I-SceI mediază tăierea țintelor ADN extracromozomiale din vectorii donori transgenici. ADN-ul țintă, este de aşteptat să se recombine cu locusul genei endogene pentru a produce o duplicație în tandem nefuncțională.

2.6. Inactivarea genelor țintă la peştele zebră

Recent genomul peştelui zebra cu dimensiuni de 2 până la 4 cm a fost complet secvențializat. Genomul haploid are $1,7x10^9$ bp, comparativ cu genomul uman care are $3\ x10^9$ bp.

Cartografierea comparativă arată conservarea extinsă a blocurilor de gene conservate, spațial localizate pe cromozomi (syntenies) între genomul peştelui zebră şi mamifere. Date directe despre funcția majorității celor 30 000 de gene din genomul peştelui zebră sunt facilitate de dezvoltarea rapidă a tehnologiei pe bază de morfoline, care poate fi aplicată la acest model de organism.

Morfolinele (fig. 2.12) sunt oligonucleotide antisens modificate, care sunt eficiente şi specifice inhibitorilor translaționali când sunt injectate în ouăle fecundate ale peştelui zebră [Heasman J., 2002]. Ele se leagă şi inactivează secvențe de ARNm selectate. Oligonucleotidele sunt asamblate în patru subunități, fiecare dintre ele conținând una dintre cele patru baze azotate: adenina, citozina, guanina şi timina legate în poziția 6 la inelul morfolinelor, ceea ce conferă o înaltă rezistență nucleazică.

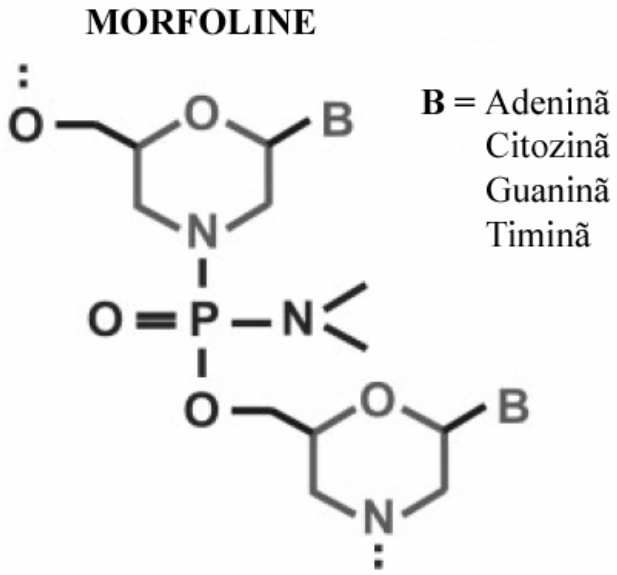


Figura. 2.12 . **Structura chimică a morfolino oligonucleotidelor**. Segmentul morfolino nucleotidelor cuprinde 2 subunități unite printr-o subunitate de linkage.

Morfolinele conțin 21-25 de baze într-o ordine specifică. Oligonucleotidele sunt concepute pentru a se lega la regiunea 5' netranslatată şi includ aminoacidul de inițiere metionină specific ARNm. Ele acționează prin intermediul unui bloc steric al complexului de inițiere translațională, iar datorită secvenței specifice şi afinității mari, ele au randament fiabil şi reproductibilitate fenotipică. Pentru inactivarea unei singure sau mai multor gene, morfolinele sunt injectate în gălbenuşul de ou aflat în etapa embrionară, de 1 la 4 celule. Embrionii se dezvoltă în afara mamei şi, prin urmare, nu sunt resorbiți în cazul în care mor în timpul embriogenezei datorită morții cauzate de inactivarea genelor.

După fertilizarea ouălor, organismul cu toate organele sale se dezvoltă în termen de 24 de ore (echivalentul a aproximativ 9 zile la şoareci). Embrionii sunt, de asemenea, complet transparenți facilitând observarea celulelor condamnate la moarte. Embrionii au fost analizați morfologic la 1-5 zile după injectarea de morfoline, adică într-un stadiu de dezvoltare, când peştele zebră deja înoată liber. În contrast cu genele țintă de la şoareci, care în mod normal necesită luni sau chiar ani pentru determinarea funcției genei, inactivarea genelor țintă pe bază de morfoline la peştele zebră permite determinarea funcției genei la nivel de zile. Modelul animalul este, deosebit de potrivit pentru gene importante implicate în procese privind dezvoltarea vertebratelor, cum ar fi somitogeneza şi organogeneza.

2.7 . Deleția tulpinilor țintă de Caenorhabditis elegans

Genomul acestui nematod a fost, de asemenea secvențializat şi constă din şase cromozomi ce au în total 97 Mb de perechi de baze (mărime haploidă) şi cuprinde 19 099 de gene. Nematodul adult, este format din exact 959 de celule somatice, ce includ 302 neuroni şi 95 de celule musculare. Generațiile C. elegans au nevoie de un timp foarte scurt pentru a se dezvolta de la stadiul de ou fecundat până la stadiul de adult matur. Trei zile de la fecundarea oului, viermele poate produce singur descendenți. Strategia de gene knock-out presupune deseori utilizarea sporadică de trimetilpsoralen, care este mutagen pentru un număr foarte mare de viermi [Jansen , 1997]. Expunerea la mutageni are ca rezultat mutații aleatoare în celulele embrionare.

De exemplu, un spermatozoid ar putea fi un mutant pentru o genă specifică. Fertilizarea ovului de acest spermatoizoid va avea ca rezultat indivizi heterozigoți. Pentru că este un vierme hermafrodit care realizează singur fertilizarea, se vor produce ovule şi spermatozoizi, care poartă această genă mutantă; un sfert din următorii săi descendenți vor fi homozigoți pentru alela mutantă, rezultatul fiind un fenotip specific. Un astfel de animal poate fi investigat în termen de trei zile, dacă fenotipul mutant este complet.

Screeningul viermilor expuşi la un mutagen se face după cum urmează: viermi sunt împărțiți în mai multe subculturi mici, permițându-le să aibă descendenți. O porțiune din fiecare subcultură este păstrată în viață în congelator, şi ADN genomic este luat de la restul de cultură. Prin urmare, acest ADN este sintetizat de frații viermilor congelați şi poartă aceleaşi mutații ca şi viermii congelați. Cu o foarte mică frecvență (aproximativ 1 din 200 000 genomuri mutagene) mutageneza va produce o deleție mică (100-1000 bp) la nivelul oricărei gene. Dacă primerii PCR ce flanchează zona genei de interes sunt folosiți pentru a amplifica probe de ADN genomic, delețiile dintre primeri pot fi detectate, generându-se ampliconi PCR de dimensiuni mai mici decât cei din ADN-ul genomic de tip sălbatic amplificat.

Astfel, ADN-ul, reprezentând mai multe mii de genomuri cu mutații poate fi supus screening-ului şi ampliconii generați ce prezintă deleții din aceste genomuri vor fi detectați. După ce un fragment de ADN care conține o anumită deleție este astfel evidențiată, se pot identifica subculturile de viermi în care a avut loc deleția; viermii congelați din această subcultură pot fi decongelați, şi animalele vii purtătoare ale mutației, pot fi identificate. Indivizii mutanții care au fost detectați, pot fi recuperați şi crescuți în continuare pentru a studia funcția genei. La sârşitul anului 2002 aproximativ 10% din genele lui C. elegans au fost identificate prin mutații . O treime din aceste gene au corespondent la mamifere, şi înțelegerea funcțiilor la C.elegans ne va ajuta să stabilim dacă acestea funcționează la animale mai evoluate.

CAPITOLUL 3

SISTEME DE TESTE BAZATE PE GENE REPORTER CARE INVESTIGHEZĂ RECEPTORII CUPLAȚI CU PROTEINA G IMPLICAȚI ÎN DESCOPERIREA DE NOI MEDICAMENTE

3.1. Receptorii şi comunicarea celulară

Organismele superioare, printre care, şi omul, conțin milioane de celule care au un rol important în reglarea funcțiilor fiziologice. În consecință, celulele au capacitatea de a comunica una cu cealaltă şi o disfuncție de comunicare celulară poate conduce la diverse boli. În controlul funcției celulare, o influență considerabilă o au moleculele de semnalizare extracelulară şi complementar acestora numeroase proteine receptor [Uings, 2000]. Fiecare celulă răspunde la un anumit set de semnale care acționează în diverse combinații pentru a regla comportamentul celulelor. Din cauza structurii unice tridimensionale a proteinei receptor, numai câteva molecule de semnalizare sunt capabile de a se lega de un anumit receptor. Prin urmare, fiecare celulă acționează într-un mod caracteristic şi programat.

Cele mai multe molecule de semnalizare extracelulară, cum ar fi adrenalina, serotonina, dopamina şi neuropeptidul Y sunt hidrofile, şi pot activa receptorii proteinelor numai la suprafața celulelor țintă. În consecință, receptorii transmit semnalul prin conversia evenimentelor extracelulare în semnale intracelulare care modifică comportamentul celulelor țintă.

Există trei mari familii de receptori de suprafață celulară, care aparțin la aceeaşi familie de proteine transmembranare: i) receptorii cuplați cu canale ionice, ii) receptorii de suprafață cu activitate enzimatică şi iii) receptorii cuplați cu proteine G. Fiecare familie asigură o transducție specifică a semnalelor extracelulare.

3.1.1. Receptorii cuplați cu canale ionice

Una din clasele de receptori de suprafață celulară sunt receptorii cuplați cu canale ionice, cunoscuți, de asemenea, ca şi canale ionice dependente de ligand (LGICs). Aceşti receptori sunt diferiți de receptorii cuplați cu proteine G (GPCRs) şi sunt implicați în semnalizarea sinaptică rapidă prin circulația ionilor prin canalele cu poartă controlate de neurotransmițători. De obicei, canale ionice cu poartă dependente de ligand sunt închise în stare de repaus, dar se deschid ca răspuns la agonişti. După activare, canalele implicate se desensibilizează spontan. Schimbările de potențial membranar produse constituie un semnal care poate fi ulterior prelucrat de către celule receptoare.

În prezent, se cunosc trei superfamilii de canale ionice cu poartă dependente de ligand: superfamilia de receptori nicotinici, familia de receptori glutamatergici şi de receptorii ATP.

Superfamilia de receptori nicotinici este compusă din mai multe familii de receptori, inclusiv receptorii nicotinici pentru acetilcolină, receptorii 5-hidroxitriptamină $(HT)_3$ pentru serotonină, receptori pentru acidul γ-aminobutiric $GABA_A$ şi GABAc, şi receptorii pentru glicină sensibili la stricnină [Chebib M, 2000]. Cei mai studiați şi cel mai bine-înțeleşi dintre aceşti receptori sunt receptori GABA şi cei pentru acetilcolină. Aceştia se consideră a fi compuşi pentamerici ai subunităților de proteine şi sunt caracterizați printr-un domeniu N-terminal extracelular mare.

Cea de-a doua superfamilie de receptori, receptorii glutamatergici excitatori sunt abundenți în cele mai multe regiuni ale sistemului nervos central la mamifere. Din această superfamilie fac parte: receptorii pentru N metil-D-aspartat (NMDA), receptorii pentru acidul propionic α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol (AMPA) şi receptorii kainat [Burnashev , 2000]. Receptorii nativi conțin patru sau cinci subunități care sunt asamblați ca homomeri, dubleți sau triplete.

Subtipul de receptori ATP P_2X sunt membrii ai celei de a treia superfamilii, şi au o distribuție largă în cadrul sistemului nervos central şi sistemului cardiovascular.

3.1.2. Receptorii de suprafață cu activitate enzimatică

Receptorii cu activitate enzimatică sunt legați de proteinele transmembrane prin domeniul de legare al ligandului de pe suprafața exterioară a membranei plasmatice. Domeniul lor citosolic fie are o activitate enzimatică intrinsecă, fie este asociat direct cu o enzimă. Fiecare subunitate a unui receptor catalitic are doar un domeniu transmembranar. Cei mai importanți receptori din această familie sunt receptorii tirozin kinazici şi receptori asociați tirozin kinazei. Mulți receptori cunoscuți, cum ar fi receptorii factorului de creştere epidermic (EGF) [Leof, 2000], receptorii pentru insulină, receptorii pentru factorul de creştere derivat din trombocite (PDGF) şi receptorii pentru factorul de creştere al endoteliului vascular (VEGF) aparțin grupului de receptori tirozin kinazici [Simon, 2000].

Aceşti receptori sunt singurii cu helixuri transmembranare care dimerizează după legarea ligandului, excepția fiind cea a receptorului de insulină, ce este deja un dimer transmembranar [Cruce, 2000]. După dimerizare, are loc autofosforilarea receptorilor, care determină fosforilarea a mai multor tipuri de molecule de semnalizare la nivelul resturilor tirozin specifice. De exemplu, activitatea Ras este stimulată, şi, astfel, nivelul de mesager secund crescut modulează factori de transcripție şi alte proteine celulare. Receptorii tirozin kinazici joacă un rol important în reglarea metabolismului celular, proliferarea şi diferențierea celulară.Receptorii pentru citokine aparțin receptorilor asociați tirozin kinazei. Aceştia prezintă un domeniu extracelular de legare al ligandului, un singur domeniu transmembranar şi un domeniu intracelular. Domeniul intracelular nu are activitate catalitică. Receptorii pentru interleukine sunt exemple de receptori asociați tirozin kinazei. După legarea ligandului, o tirozin kinaza asociată cu receptorul este activată prin fosforilare. Kinazele Src sau Jak sunt exemple de tirozin kinaze de acest tip. Activarea tirozin kinazei are ca rezultat fosforilarea proteinelor cu rol în transducția semnalului şi activarea transcripției (STAT) care acționează ca factori de transcriere.

Mai mult decât atât, receptorii serin/treonin kinazici mai sunt cunoscuți sub numele de receptori cu activitate enzimatică de suprafață, fiind implicați în mai multe procese celulare, cum ar fi proliferarea, migrarea şi diferențierea. Aceşti receptori

conțin o mică regiune extracelulară, un singur domeniu transmembranar şi o regiune citoplasmatică, care acționează ca o serin/treonin kinază. Un reprezentant al acestei familii [Zhu, 2001] este receptorul factorului de creştere transformant (TGF)-β.

O altă familie de receptori celulari de suprafață cu activitate enzimatică sunt receptorii pentru guanilil/guanilat ciclaza. Receptorul pentru peptidul natriuretic atrial este cel mai cunoscut membru al acestei familii şi catalizează formarea de GMPc. Efectele majore sunt natriureza, diureza şi inhibarea sintezei de aldosteron.

3.1.3. Receptori cuplați cu proteina G (GPCRs)

GPCRs reprezintă cea mai mare şi cea mai importantă familie de receptori transmembranari caracterizați prin secvențe de aminoacizi, care conțin şapte domenii hidrofobe. Aceste domenii reprezintă regiuni transmembranare întinse ale proteinelor (7 domenii transmembranare) care au dat cel de-al doilea nume pentru această superfamilie - 7TM / receptorii în heptahelix [Lefkowitz, 2000]. La mamifere, această familie conține mai mult de 600 de membri. Ei sunt implicați într-un spectru larg de procese biologice care au rol în medierea semnalelor pentru o mare varietate de stimuli, cum ar fi hormoni peptidici (glucagonul, angiotensina, bradykinina), neurotransmițători (adrenalina, serotonina, dopamina), neuropeptidele (neuropeptidul Y), lumina şi odorizantele. În consecință, ei joacă un rol important în reglarea fiziologică, iar funcționarea lor defectuoasă poate să inducă numeroase boli.

În general, ligandul se leagă la GPCRs şi produce o schimbare conformațională care conduce la asocierea de proteine G intracelulare. Aceste proteine G sunt membrii ai superfamiliei de GTP-aze ce sunt caracterizate printr-o compoziție heterotrimerică ce cuprinde subunitățile α, β şi γ. Clasificarea structurală şi funcțională a proteinelor G - a fost definită de subunitățile α , în funcție de care pot fi împărțite trei clase de proteine: Gαs, Gαi şi Gαq (fig. 3.1). Asocierea proteinei G la receptorul transmembranar provoacă modificări conformaționale în proteinele G care facilitează eliberarea GDP şi legarea GTP. Legarea GTP determină separarea subunității α de subunitățile β şi γ (Cruce, 2000). Proteinele Gαs cunoscute ca proteine G de stimulare, activează adenilil ciclaza (AC) care catalizează producerea

de mesager secund AMPc. În schimb, proteina Gαi inhibă AC, conducând la scăderea nivelului de AMPc (fig. 3.1).

Activarea proteinei Gαq este urmată de stimularea fosfolipazei C (PLC) care induce producerea celui de-al doilea mesager secund diacilglicerolul(DAG) sau inozitol trifosfatul (IP3) (fig. 3.1), în timp ce Gαq interacționează cu canalele de K. Activarea celui de-al doilea mesager conduce la o amplificare imensă a semnalului [Marinissen şi colab., 2001]. De exemplu, AMPc poate activa protein kinaza A (PKA), care stimulează fosforilarea altor proteine (fig. 3.1). În plus, se ştie că subunitatea βγ a proteinelor G poate activa proteina activatoare a mitozei (MAP) pe calea MAPK kinazei (fig. 3.1).

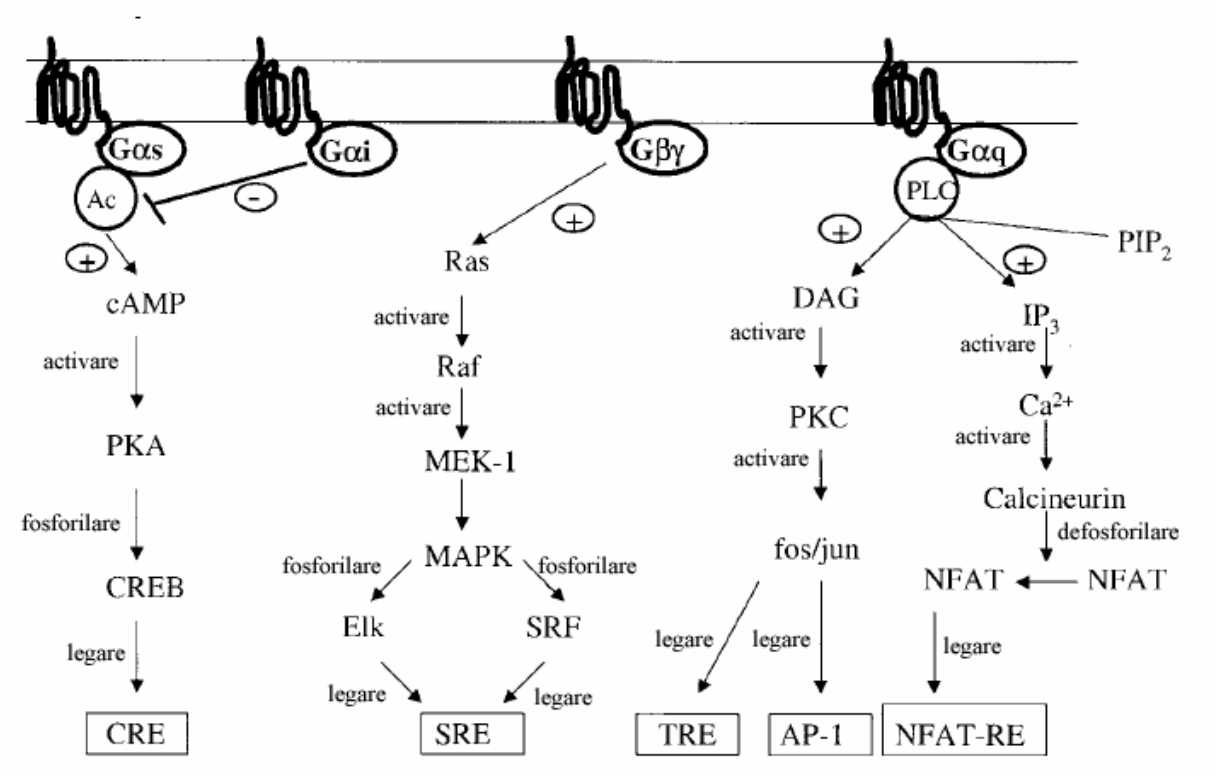


Fig. 3.1 Diagrama schematică a căilor de transducție a semnalului de la GPCR şi a diferitelor căi ale mesagerilor secunzi care comunică cu elemente promotor nucleare. (AC, adenilil ciclaza; CRE, elementul de răspuns la AMPc; proteina de legare CREB; DAG, diacil glicerol, IP3, inozitol trifosfat; MAPK, protein kinaza mitogen activată; MEK, MAPK kinaza; NF-AT, factor nuclear al celulelor T activate; NF-AT-RE, elementul de răspuns NF-AT; PKA, protein kinaza A; PKC, protein kinaza C; PLC, fosfolipaza C; PIP2, fosfatidilinozitol-4 ,5-bifosfat; SRE, element de răspuns seric; SRF,factor de răspuns seric; TPA, 12-O-tetradecanoilforbol - 13-acetat; TRE, TPA- elementul de răspuns).

Pe lângă căile clasice, există căi independente de proteina G, ceea ce înseamnă că GPCRs poate activa molecule cum ar fi kinaza 2 legată la semnal extracelular (ERK) 2 sau STATS fără stimularea proteinei G [Cruce şi colab., 2004].

GPCRs au fost clasificați în trei subfamilii: subfamilia rodopsinei (clasa 1), subfamilia calcitoninei (clasa 2) şi subfamilia receptorilor pentru glutamatul metabotropic (clasa 3) [Beck-Sickinger, 1996]. Clasa 1 conține aproximativ 90% din toți GPCRs şi se caracterizează printr-un segment N-terminal care este puternic glicozilat, şi dispune de o punte disulfidică caracteristică între bucla 1 extracelulară şi bucla 2 extracelulară. Odorizantele, peptidele şi alte molecule mici, precum şi multe glicoproteine se leagă de receptorii familiei din clasa 1, cum ar fi receptorii pentru adrenalină, serotonină sau pentru neuropeptidul Y. Cel mai cunoscut membru din această familie este rodopsina, care conferă întreagii familii numele său. Structura cristalizată a rodopsinei a fost determinată de către Palczewski şi colab. (2000). În principal, hormonii peptidici şi neuropeptidele, cum ar fi secretina, glucagonul şi calcitonina se leagă de receptorii din familia GPCR din clasa 2. Aceştia au un domeniu extracelular N-terminal mare, comun, care conține şase reziduri de cisteină. Cel de-al treilea şi, de departe, cel mai mic grup de GPCRs (clasa 3) se caracterizează printr-un domeniu uriaş N-terminal constituit din două lobi care se închid asemănător plantei *Venus flytrap* pe ligandul prins. Receptorii pentru glutamatul metabotropic şi receptorii GABAb aparțin acestei subfamilii de receptori. Mai mulți receptori pentru liganzii de fungi şi de plante au fost, de asemenea, caracterizați şi clasificați în subtipuri speciale. GPCRs sunt proteine cheie în reglarea fiziologică şi funcționarea lor defectuoasă determină câteva boli,ale căror mecanisme au fost elucidate prin studii pe şoareci GPCR knockout [Edwards şi colab., 2001]. În prezent, GPCRs sunt țintele pentru mai mult de 50% din actualii agenți terapeutici şi, ca atare, industria farmaceutică, este interesată foarte mult de investigarea GPCRs [Sautel M, 2000]. În ceea ce priveşte dezvoltarea de noi medicamente, este important să se producă compuşi foarte specifici care se leagă cu un înalt grad de afinitate şi selectivitate de un anumit GPCR. Numai aceste caracteristici sunt garanția eficienței terapeutice în special în ceea ce priveşte tolerabilitatea şi specificitatea reacțiilor adverse.

3.2. Afinitatea şi activitatea liganzilor GPCR

După cum s-a menționat mai sus, GPCRs sunt ținte pentru o varietate de medicamente, pentru că afinitatea şi activitatea unui ligand pentru receptor trebuie să fie cunoscute în scopul producerii de noi medicamente. Afinitatea ca proprietate descrie aviditatea sau tenacitatea cu care un ligand se va leaga de receptorul său. De asemenea, activitatea numită eficacitate intrinsecă, este proprietatea unui ligand de a produce un răspuns biologic. Potențialele medicamente ar trebui să aibă o mare afinitate şi selectivitate. O selectivitate înaltă garantează o reducere a reacțiilor adverse, iar o afinitate mare permite reducerea dozei de medicament. Liganzii naturali ai GPCR sunt adesea folosiți ca şablon pentru design-ul medicamentelor şi de aceea sunt generați noi liganzi cu structuri similare.

Teste convenționale cu un radiotrasor sunt în general utilizate pentru a determina afinitatea unui ligand de un receptor. Toate celulele sau membranele celulare ce exprimă GPCRs sunt incubate cu un ligand radiomarcat în prezența ligandului nemarcat care trebuie investigat. Sunt utilizate o concentrație constantă de radiotrasor şi diferite concentrații de ligand nemarcat. După ce se ajunge la echilibru, celulele sau membranele sunt separate de supernatant şi radioactivitatea ligandului radiomarcat legat poate fi măsurat cu un aparat de măsurare. Radioactivitatea măsurată este proporțională cu concentrația de ligand radiomarcat, care se leagă de receptor. Curba de legare poate fi determinată prin utilizarea de concentrații diferite de ligand nemarcat în prezența unui radiotrasor cu concentrație constantă şi valoarea IC_{50} poate fi obținută şi transformată în valoare Ki conform ecuației Cheng-Prussof. Ki reflectă afinitatea ligandului pentru GPCR, o valoarea Ki este cu atât este mai mică, cu cât afinitatea este mai mare.

Pentru a determina eficacitatea intrinsecă a liganzilor, potențialul lor agonist sau antagonist, au fost introduse diferite teste care măsoară activitatea proteinelor G sau mesagerilor secundari intracelulari după legarea de ligand. Mesagerii secundari investigați depind de receptorii de activare a proteinelor G. Aceste metode sunt de cele mai multe ori mari consumatoare de timp şi foarte costisitoare. Mai întâi, este posibil să se măsoare legarea GTP după activarea receptorilor prin intermediul

ligandului. Celule sau membranele care exprimă receptorii sunt incubate în prezența GTP-ului radiomarcat şi ligandului cercetat. Radioactivitatea poate fi măsurată după separarea celulelor sau membranelor de supernatant. Valorile radioactivității sunt corelate cu stimularea receptorilor care sunt asociați cu proteina G.

Testele ELISA convenționale pot fi utilizate pentru a măsura mesagerii secunzi ca: AMPc, GMPc, diacil glicerol sau IP3. Concentrația de AMPc mesager secund depinde de tipul de proteină G activată şi poate duce fie la creşterea (Gαs,) sau fie la scăderea (Gαi) mesagerului secund. Determinarea semnalului de la nivelul celui de-al doilea mesager este uneori foarte dificilă pentru că nu toate celulele exprimă optim proteine G sau mesagerul secund care este imediat degradat. Prin urmare, genele reporter în combinație cu promotori speciali şi elemente intensificatoare sunt folosite pentru a genera un set nou de tehnici. După legarea ligandulului la GPCR, este modulată concentrația de mesager secund, activitățile enzimelor, şi prin urmare legarea factorilor de transcriere de elementele intensificatoare. În consecință, expresia genelor reporter este dependentă direct de activarea GPCR şi de calea de transducție a semnalului activată. Semnalul rezultat este mai stabil şi mai uşor de cuantificat.

3.3. Rolul factorilor de transcripție în expresia genelor

Informația necesară pentru sinteza unei anumite proteine este codificată în secvența de nucleotide din ADN. Aceste informații trebuie să fie transcrise în ARN, molecula mesager, care apoi este tradusă în citoplasmă, de aparatul de sinteză proteică.

Enzime specializate, numite ARN polimeraze, catalizează procesul de transcripție al ADN-ului în ARN. ARN polimeraza II transcrie majoritatea genelor; cu toate acestea, multe alte proteine accesoare care interacționează cu polimeraza sunt esențiale pentru transcripția genelor. Numeroşi factori de transcripție nucleari sunt cunoscuți şi rolul lor este, fie de a activa, fie de a inhiba expresia genelor [Brivanlou şi colab., 2002]. Ei se leagă de secvențele scurte cu semnificatie biologică, din regiunile de ADN dublu catenar, de lungimi variabile, de obicei 5-20 bp. Aceste secvențe scurte sunt situate în amonte de promotorul de bază şi, în general, sunt

specifice pentru un singur factor de transcripție sau pentru un membru al unei singure familii de factori de transcripție. Factorii de transcripție se pot lega ca monomeri, homodimeri sau heterodimeri la secvențele repetitive specifice. După legarea de situsul lor specific de legare, factorii de transcripție interacționează între ei, cu ARN polimeraza II şi cu alți factori bazali pentru a regla expresia genei.

În prezent, mai mult de 300 de factori de transcriptie au fost identificați în genomul vertebratelor. Activitatea unor factori de transcriere este modulată de fosforilarea lor. Dintre factorii de trascripție bine înțeleşi şi studiați menționăm: proteina de legare a elementului de răspuns la AMPc (CREB), factorul de legare a elementului de răspuns seric, factorul nuclear al celulelor T activate (NF-AT), proteinele c-Jun şi STAT. Situsurile de recunoaştere a acestor factori de transcripție sunt adesea folosite în promotori pentru realizarea de sisteme de teste care utilizează genele reporter pentru investigarea GPCRs (fig. 3.1).

3.3.1. CREB (proteina de legare la elementul de răspuns la AMPc)

CREB este implicată în calea AMPc. După activarea receptorilor cuplați cu proteina Gαs, care reglează pozitiv AC, nivel intracelular de AMPc este crescut. AMPc activează proteina kinaza A (PKA), care permite unității catalitice a PKA să intre în nucleu unde fosforilează CREB, pe serină în poziția 133.

CREB fosforilată se leagă de elementul intensificator al elementului de răspuns la AMPc (CRE). Transcrierea genelor linkate este activată după legarea proteinei de legare CREB (CBP) la CREB. Stimularea GPCRs cuplați cu Gαi scade AMPc intracelular şi determină o reducere a transcripției genei reporter CRE-linkată.

3.3.2. SRF

Calea MAPK este o cale foarte importantă de semnalizare pentru receptorii tirozin kinazici şi este necesară pentru fosforilarea SRF. SRF se leagă la elementul de răspuns seric, la situsul de legare ADN prezent, de exemplu, în promotorul c-FOS, care conduce la transcrierea c-FOS, un alt factor de transcriere. Numai în combinație cu factorul complexului ternar (TCF/Elk1), SRF se poate lega la SRE şi activa

transcripția genei. Ambii factori de transcripție, SRF şi TCF sunt activați prin fosforilarea MAPK. S-a arătat că subunitățile βγ ale proteinelor Gαi activează această cale, via activarea MAPK RAS-dependentă. Stimularea MAPK via receptori cuplați cu Gαq are în principal ca rezultat activarea protein kinazei C (PKC) [Cruce şi colab., 2004].

3.3.3. Proteinele STAT

Proteinele care sunt factorii de transcriere STAT sunt activate după stimularea receptorilor de citokine şi receptorilor tirozin kinazici. În prezent, sunt cunoscute 6 proteine STAT (STAT1-STAT6).

După activarea receptorilor prin legarea ligandului aceşti receptori se asociază cu tirozin kinaza JAK , care, la rândul său este fosforilată. Ulterior, JAK kinazele activate pot activa din nou proteinele STAT prin fosforilare, urmate de formarea dimerilor. Dimerii sunt translocați în nucleu şi se leagă de situsurile de legare ADN ale elementului de răspuns stimulate de interferon (ISRE), şi este inițiată transcrierea genelor. Studii recente demonstrează activarea şi implicarea căii STAT3 în căile Gαi şi Gαo protein mediate [Ram , 2001].

3.3.4. c-Jun

Factorul de transcripție c-Jun este fosforilat de o protein kinază, JNK (c-Jun-N-terminal kinaza), care este un membru nou al familiei MAPK. De asemenea această kinază, fosforilează factorul de transcripție ATF2. ATF2 şi c-Jun constituie un heterodimer, care se leagă de situsul de legare ADN al elementului de răspuns TPA (TRE) în promotorul c-Jun.

3.3.5. NF-AT

NF-AT este prezent ca factor de transcriere în limfocite şi este indus de stimularea receptorului antigenic. NF-AT este fosforilat şi situat în citoplasma celulelor în repaus. Controlul transcripției mediată de NF-AT în limfocite este dependent de semnalizarea simultană prin Ca şi MAPK care sunt activate după

stimularea receptorilor de antigen. Calea Ca activează calcineurin fosfataza. Calcineurina defosforilează NF-AT şi conduce la o translocare nucleară a NF-AT. Apoi, NF-AT se asamblează într-un complex multimeric cu AP1 şi se leagă în amonte la un intensificator major al genei pentru citokina IL-2 după care are loc transcripția genei. Izoforme distincte de NF-AT care se găsesc la oameni şi şoareci, sunt exprimate în celulele nonlimfoide.

3.4. Genele reporter

O genă reporter este o secvență de ADN, al cărei produs este sintetizat ca răspuns la activarea cascadei de semnalizare investigată. Expresia genelor reporter poate fi controlată de elemente intensificatoare, şi situsuri de legare pentru factorii de transcripție specifici. Alegerea unei gene reporter specifice, depinde de următoarele condiții:

- linia de celule utilizată pentru experimente; activitatea endogenă din fiecare celulă este diferită şi este important să demonstrăm că linia de celule utilizată nu exprimă gena reporter aleasă;
- natura experimentului, deoarece trebuie să fie utilizate gene reporter diferite pentru investigarea dinamicii expresiei genei şi a eficienței transfecței în acelaşi experiment;
- alegerea genei reporter depinde de asemenea, de metoda de detecție.

Genele reporter au caracteristici speciale. Ele sunt caracterizate printr-o secvență definită de nucleotide, activitate de fond scăzută, sensibilitate mare şi răspunsul care trebuie să fie uşor de detectat fenotipic. În scopul de a efectua măsurători, activitatea genelor reporter trebuie să fie cantitativă, rapidă, uşoară, reproductibilă şi sigură. Metodele de măsurare care sunt folosite de cele mai multe ori sunt măsurători de radioactivitate, fluorescență, luminiscență şi colorimetrie.

Semnalul genelor reporter trebuie să fie semnificativ peste activitatea bazală care depinde de chimia reporterului, linia de celule utilizată, sensibilitatea instrumentelor şi interferențele activităților chimice.

Sisteme genetice reporter au fost elaborate cu scopul de a studia expresia şi reglarea genelor de la eucariote. Mai mult, ele sunt utilizate pentru studiul promotorului şi secvențelor intensificatoare, mediatorilor cum ar fi factorii de transcripție, procesarea ARNm şi translația. De asemenea, sistemele de gene reporter sunt aplicate pentru a monitoriza eficiența transfecției şi pentru a studia interacțiunea proteină-proteină, localizarea subcelulară a proteinelor şi de asemenea indicatorii activității transcripționale în celule.

În zilele noastre, sistemele de gene reporter au aplicații în screeningul biologic pentru descoperirea de noi medicamente [high-throughput screening = screening de mare capacitate (HTS)] [Goetz şi colab., 2000], pentru investigarea căilor de semnalizare şi în terapia genică. Acestea sunt, de asemenea utilizate pentru investigarea interacțiunilor receptor-ligand, în special pentru investigarea GPCRs.

Sunt cunoscute mai multe gene reporter, de exemplu, cloramfenicol acetiltransferaza (CAT), β-galactozidaza (β-Gal), β -glucuronidaza, fosfataza alcalină (AP), fosfataza alcalină secretată (SEAP), β -lactamaza, luciferaza şi proteina fluorescentă verde (GFP). Avantaje şi dezavantajele lor sunt prezentate în tabelul 3.1. Unele din aceste gene reporter sunt utilizate pentru investigarea GPCRs.

3.4.1. CAT

CAT a fost prima genă reporter utilizată pentru a monitoriza activitatea transcripțională în celule. CAT a fost izolată din *Escherichia coli* şi este o proteină trimerică care este formată din trei subunități identice, fiecare cu o greutate moleculară de 25 kDa [Leslie şi colab., 1988]. În celulele de mamifere, proteina CAT este relativ stabilă, şi fără transfecție nu există exprimare endogenă. CAT are proprietățile necesare pentru a fi utilizată în teste tranzitorii concepute, pentru a investiga acumularea proteinelor exprimate.

Reacția enzimatică naturală a CAT, transferul grupării acetil de la acetil-CoA la poziția 3-hidroxil a cloramfenicolului, este utilizată pentru a efectua teste reporter. Acetil-CoA radiomarcată permite transferul de acetil radiomarcat la substratul de cloramfenicol.

Produşii formaţi pot fi determinaţi prin separare fizică utilizând cromatografia în strat subţire (TLC). TLC separă substratul şi produsul, radioactivitatea putându-se observa prin expunerea plăcii de TLC pe filme de radiografie sau prin fosfoimagini.

Metoda TLC permite vizual confirmarea reacţiei. Cuantificarea este posibilă prin răzuirea spoturilor, TLC, extragerea cu un solvent organic şi numărarea probelor cu un dispozitiv de numărare pe bază de scintilaţie.

Alte teste izotopice se bazează pe extracţia organică directă a celor mai mulţi produşi nepolari. Alternativ, anticorpii împotriva CAT sunt acum disponibili şi ei permit cuantificarea prin Western blotting sau ELISA.

Tabelul 3.1. Comparea celor mai frecvent utilizate gene reporter

Gena reporter	**Avantaje**	**Dezavantaje**
Cloramfenicol acetiltransferaza (CAT)	- fără expresie endogenă în celule mamiferelor - confirmarea vizuală a activităţii enzimei	- costuri ridicate pentru izotopi şi sisteme TLC - radioactivitate - liză celulară - substraturi suplimentare
β-Galactosidase (β -Gal)	- formate de teste variate pentru utilizare cu extract celular - uşor de testat	- teste colorimetrice nu foarte sensibile - activitate endogenă în anumite tipuri de celule - liză celulară
β-Glucuronidaza	- formate de teste variate	- activitate endogenă în celulele mamiferelor - liză celulară
Fosfataza alcalină (AP)	- formate de teste variate - uşor de testat - necostisitor	- activitate endogenă în celulele mamiferelor - teste colorimetrice nu foarte sensibile - liză celulară
Fosfataza alkalină secretată (SEAP)	- proteină secretată - formate de teste variate - sensibilă (teste fluorimetrice)	- adiţie de substrat
Luciferaza	- rapidă şi uşoară - de mare sensibilitate - fără activitate endogenă	- liză celulară - adiţie de substrat - proteină relativ stabilă
Proteina fluorescentă verde (GFP)	- variante GFP pot fi detectate în aceeaşi celulă - investigaţii în celule vii - autofluorescenţă (nu necesită substrat)	- cititor fluorescent sensibil

3.4.2. β -Gal

β -Gal este o enzimă bacteriană bine caracterizată şi este compusă din patru subunităţi, fiecare cu o greutate moleculară de 116 kDa. Cataliza hidrolizei zaharurilor de β -Gal cum ar fi lactoza este raportat ca un test funcţional. Activitatea enzimatică din extractele celulare poate fi analizată cu diferite substraturi speciale, care să permită cuantificarea activităţii enzimei cu un spectrofotometru, fluorimetru sau luminometru.

De asemenea, au fost dezvoltate metode de colorimetrie simplă cu o-nitrofenil-BD-galactopiranozid (ONPG) sau clorofenol roşu BD-galactopiranzoid (CPRG) [Eustice şi colab., 1991]. Metodele colorimetrice, care nu sunt foarte sensibile şi au doar o gama dinamică îngustă, au fost înlocuite în mare parte cu metode fluorescente sau luminiscente mai sensibile. Substraturi, cum ar fi β -metil umbeliferil galactozidul şi fluorescein digalactozidul (FDG) pot fi folosite pentru teste bazate pe fluorescenţă, iar 1,2-dioxetanul pentru teste pe bază de luminescenţă. Testele reporter cu β – galactozidază sunt larg utilizate, în special pentru a monitoriza eficienţa transfecţiei.

3.4.3. β -Glucuronidaza

β -Glucuronidaza este o glicoproteină tetramerică de la E. coli, formată din patru subunităţi identice de 68 kDa, localizate în special în mediul acid al lizozomilor. Enzima înlătură rezidurile de acid β -glucuronic terminale de la capătul neredus al glicozaminoglicanilor şi altor glicoconjugaţi. Teste colorimetrice ce pot fi detectate prin spectrofotometrie, au fost elaborate cu scopul de a măsură activitatea acestei enzime. Metodele chemiluminescente au fost create pentru îmbunătăţirea sensibilităţii. β -glucuronidaza este de cele mai multe ori folosită pentru investigaţii la plante superioare, şi din cauza activităţii sale endogene în unele celule de mamifere [Paigen, 1989].

3.4.4. AP (fosfataza alcalină)

AP este o proteină relativ stabilă şi care la pH alcalin defosforilează o gamă largă de substraturi . Metode spectrofotometrice standard se bazează pe hidroliza p-

nitrofenil fosfatului (PNPP) de AP. Acest test este ieftin, rapid şi simplu, dar îi lipseşte sensibilitatea obținută prin alte metode. O metodă bioluminescentă în 2 trepte a fost elaborată cu scopul de a îmbunătăți sensibilitatea. În această abordare cu două etape, mai întâi AP hidrolizează d-luciferin-O-fosfatul la d-luciferin, care serveşte în cea de a doua etapă ca un substrat pentru luciferază. Deşi sensibilitatea este mult mai mare, manipularea este mai puțin convenabilă. Ca o alternativă a fost dezvoltată o metodă chemiluminescentă pentru detecția AP într-o singură etapă [Schaap , 1989].

3.4.5. SEAP (fosfataza alcalină secretată)

SEAP este o formă mutantă de AP placentară umană, căreia îi lipsesc 24 de aminoacizi la capătul C-terminal al proteinei. Eliminarea acestor aminoacizi împiedică ancorarea enzimei la membrana plasmatică, şi, în consecință, este secretată de celule şi poate fi detectată prin prelevarea de probe din mediu de cultură [Berger şi colab., 1988]. Celule rămâne intacte şi viabile pentru experimente ulterioare. SEAP poate fi uşor detectat prin hidroliza p-nitrofenol fosfatului, care determină o schimbare de culoare. Această modificare poate fi cuantificată.

Metodele chemiluminescente pot fi, de asemenea, utilizate în plus față de metodele colorimetrice. Un avantaj major al SEAP este stabilitatea la căldură a enzimei şi la L-homoarginina fosfataz inhibitoare. Prin urmare, celulele lizate pot să fie tratate cu căldură sau L-homoarginină pentru a inactiva activitatea bazală a AP , în celule în care poate a intrat în mediul de cultură. Astfel, activitatea bazală observată cu sisteme reporter AP este, în principal, eliminată cu sistemul SEAP. Asocierea de proteine reporter secretate, cu activitate de fond puțin endogenă, precum şi cu o varietate largă de teste uşoare şi sensibile fac din SEAP un sistem convenabil şi flexibil.

3.4.6. β -lactamaza

Proteina β –lactamaza (penicilin amido- β -lactamhidrolaza) este o proteină monomerică de 29-kDa, izolată din E. coli. Această enzimă are activitate esterazică şi funcția sa naturală este clivarea ampicilinei şi altor antibiotice, de exemplu, penicilina

şi cefalosporina. β –lactamaza este produsă industrial în trei forme: secretată, citosolică şi asociată membranei plasmatice [Moore şi colab., 1987]. În consecință, activitatea enzimei poate fi analizată din extracte celulare sau, atunci când este secretată, direct din mediu.

Metode colorimetrice sunt aplicate pentru măsurători, de exemplu pentru substraturi ca nitrocefin sau (PADAC) [acid 3 -(2,4-dinitrostiril)-(6R, 7R)-7-(2-tienilacetamido)-cef-3-em-4-carboxilic] îşi schimbă culoarea după reacția cu β -lactamaza. Activitatea enzimei cu PADAC ca substrat este monitorizată prin scăderea absorbanței la 570 nm şi cu nitrocefin prin creşterea absorbanței la 570 nm. Recent, un substrat fluorescent foarte sensibil pentru β -lactamază a fost dezvoltat ca un ester membranar permeabil, care ar putea fi aplicat pentru a monitoriza expresia genei la o singură celulă vie. Acest substrat fluorogenic CCF2/AM este o cefalosporină derivată, ataşată la doi fluorofori. În cazul în care substratul fluorogenic este intact, fluorescența cu transfer de energie prin rezonanță (FRET) apare între cei doi fluorofori [Zlokarnik şi colab., 1998]. În cazul în care substratul este de clivat de către β -lactamază, cele două părți fluorescente ale moleculei sunt separate şi efectul FRET este întrerupt. Schimbarea lungimi de undă rezultată este detectabilă în suspensie celulară folosind sortarea celulară pe bază de fluorescență, în monostraturile celulare utilizând cititoare de plăci convenționale iar în celule individuale utilizând microscopia confocală. Tehnicile de gene reporter cu β -lactamază sunt foarte sensibile, la utilizarea acestui substrat fluorogenic, dar şi costisitoare.

3.4.7. Luciferaza

Luciferaza se referă la o familie de enzime care catalizează oxidarea de substraturi diferite ca luciferina şi coelenterazina, ceea ce conduce la emisie de lumină. Luciferezele cunoscute sunt luciferaza bacteriană, luciferaza Firefly *(Photinus pyralis)* (*firefly* = gândac nocturn din America tropicală care produce lumina, corpul este luminiscent datorita organelor abdominale), şi mai recent, luciferaza renilla din panseaua de mare bioluminiscentă, *Renilla reniformis.*

Luciferazele bacteriene sunt, în general, proteine dimerice labile termic. În consecință, aplicarea lor ca gene reporter în celulele de mamifere este limitată.

Cea mai cunoscută luciferază este luciferaza firefly. Acestă enzimă de 60kDa, o monooxigenază, catalizează o reacție utilizând D-luciferin şi ATP, în prezența oxigenului şi Mg, conducând la emisie de lumină [Branchini şi colab., 2001]. Valoarea totală a luminii măsurate într-un anumit interval de timp este proporțională cu activitatea luciferazei din probă. Structura cu raze X a acestei luciferaze, descoperită în 1996, a evidențiat că arginina din pozitia 218 constituie situsul de legarea al luciferinei.

Mai recent, au fost dezvoltați reactivi care prelungesc timpul de înjumătățire a flash-ului. Prelungirea luminii produse creşte sensibilitatea testului şi asigură o mai mare durată de înjumătățire a luminiscenței şi, astfel, o perioadă mai lungă de măsurare.

Luciferaza din *R. reniformis* [Lorenz şi colab., 1996] catalizează oxidarea coelenteramidei şi este de cele mai multe ori folosită în formate de testare cu luciferaze duale. Aceste teste permit măsurarea ambelor luciferaze firefly şi renilla din acelaşi extract celular. Prin urmare, luciferaza firefly poate fi folosită ca genă reporter şi luciferaza renilla ca un standard intern pentru a cuantifica eficienței transfecției [Parsons şi coalb., 2000]. Luciferaza firefly, este utilizată de cele mai multe ori pentru studiul reglării promotorului şi efectelor reglatoare ale agenților ce cresc AMPc.

În prezent, luciferaza rămâne în continuare reporterul ales pentru măsurătorile dinamice ale expresiei genelor, datorită sensibilității înalte şi duratei de înjumătățire a vieții, relativ scurtă. Aceasta a permis, de exemplu, investigarea ritmurilor circadiene la plante.

Mai mult decât atât, tehnici de gene reporter cu luciferaza firefly au fost generate pentru investigarea GPCRs şi pentru identificarea receptorilor agonişti şi antagonişti. Acest sistem este foarte popular în industria farmaceutică şi este utilizat pentru HTS.

3.4.8. Proteina fluorescentă verde (GFP)

GFP din peştele jeleu *Aequorea victoria* este o fotoproteină cu 238 amino-acizi care emite lumină verde, cu o emisie maximă la 509 nm după excitarea la 488 nm [Tsien, 1998]. ADNc a fost clonat în 1991 şi structura cristalină identificată în 1996 [Ormo, 1996]. GFP are marele avantaj că este un fluorescent natural, care nu are nevoie de oricare alte substraturi, iar fluorescența nu este specifică speciei. Mai mult decât atât, GFP poate fi folosit în celulele vii şi pentru producerea de proteine de fuziune.

Cromoforul activ din GFP, necesar pentru fluorescență, este un hexapeptid care conține un trimer ciclizat Ser-dehidroTyr-Gly [Fukuda, 2000]. Acest cromofor este situat în centrul proteinei, a cărei structură este menționată ca o posibilă structură β. Mutații în cromoforul activ al alelei GFP de tip sălbatic a condus la dezvoltarea de variante GFP cu fluorescență verde îmbunătățită. Au rezultat trei variante mutante: proteina fluorescentă albastru-gălbuie (PCP), proteina galben fluorescentă (YFP) şi o proteină albastru fluorescentă (BFP). Expresia GFP poate fi monitorizată direct în organismele vii, ca şi în celule. Alte avantaje sunt stabilitatea termică, pH-ul extrem şi denaturanții chimici.

În ultimii ani, mai multe proteine de fuziune cu GFP au fost construite pentru a investiga proteinele de transport şi localizarea lor [Welsh, 1997]. Imaginea expresiei genei este uşor de realizat datorită proprietăților GFP [Chalfie, 1994]. Dezvoltarea GFP şi a variantelor sale spectrale permit urmărirea simultană a diferitelor proteine la celulele vii.

Mai mult, investigarea interacțiunii proteină-proteină este posibilă cu ajutorul tehnicii FRET, pentru că GFP şi variantele sale pot fi utilizate ca perechi FRET [Sorkin, 2000].

S-au efectuat experimente cu proteine de fuziune GFP pentru a investiga reglarea GPCR. GFP a fost de asemenea utilizat pentru a genera sisteme de teste de gene reporter pentru investigarea GPCRs. Dinger şi Beck-Sickinger (2002) au identificat agoniştii şi au determinat afinitatea ligandului.

3.5. Sisteme de teste bazate pe gene reporter pentru investigarea GPCRs

În ultimii ani, sisteme de teste bazate pe gene reporter au fost dezvoltate pentru investigarea GPCRs, sisteme care oferă o alternativă la testele biochimice convenționale, cum ar fi testele de competiție şi testele AMPc. Acum este posibilă investigarea căilor de transducție a semnalului de la nivelul receptorilor de la suprafața celulelor până la transcripția genelor nucleare în celule. Prin utilizarea aceste sisteme de testare poate fi uşor măsurată schimbarea mesagerului secund după activarea GPCR prin creşterea sau scăderea exprimării genei reporter. Până acum nivelul intracelular de mesager secund trebuia să fie detectat prin metode metabolice speciale, dificile tehnic, incomode, consumatoare de timp şi de cele mai multe ori costisitoare.

Dezvoltarea vectorilor de gene reporter cu o secvență promotor şi o secvență genă reporter este esențială în scopul de a investiga GPCRs cu un sistem de teste pe bază de gene reporter. Alegerea promotorului depinde de natura căii de semnalizare pentru GPCR studiat, şi determină sensibilitatea şi specificitatea reporterului. Situsurile ADN de legare ale factorilor de transcripție, numite elemente intensificatoare sunt utilizate în combinație cu un promotor de bază care controlează transcripția genei reporter. În consecință, calea pentru GPCR studiat trebuie să fie cunoscută (fig. 3.1).

Dezavantajul promotorilor naturali, cum ar fi c-FOS este că trebuie să conțină situsuri de legare pentru un număr de factori de transcripție şi, astfel, reglarea unor astfel de promotori depinde de mai mulți factori de transcripție. Cu scopul de a genera teste pe bază de gene reporter pentru o singură cascadă de semnalizare, au fost construiți promotori sintetici care conțin numai un singur tip de situsuri pentru legarea factorilor de transcripție.

Secvențele promotorilor sintetici cele mai cunoscute pentru investigarea GPCRs cuprind: elemente CRE, elemente SRE, elemente TRE şi elementul intensificator NF-AT; promotorul natural c-FOS, situsul de legare AP1 şi secvența activatoare GAL4 . Datele publicate demonstrează că luciferaza este cea mai

populară genă reporter pentru investigarea GPCRs. În plus, punerea în practică a β-lactamazei şi SEAP este, de asemenea, posibilă.

Recent, a fost prezentată o GFP ca genă reporter pentru investigarea GPCRs , care prezintă unele avantaje faţă de alte gene reporter menţionate.

3.5.1. Aplicarea luciferazelor ca gene reporter

Luciferaza firefly (vezi 3.4.7) este cea mai utilizată genă reporter pentru investigarea GPCRs [Stratowa şi colab., 1995]. Gena pentru luciferază este asociată cu diferite elemente promotor cum ar fi: elementele CRE, elementele TRE, promotorul c-FOS şi elementul intensificator NF-AT. Elementul intensificator CRE este folosit pentru investigarea receptorilor cuplaţi cu Gαs şi Gαi. Prin urmare, expresia luciferazei este reglată de creşterea sau scăderea AMPc. După stimularea receptorilor cuplaţi cu Gαs, urmează o creştere a nivelului de AMPc. AMPc determină fosforilarea CREB urmată de creşterea expresiei luciferazei. În scopul de a efectua teste cu receptori cuplaţi cu Gαs, testele sunt de obicei, efectuate în prezenţă de forskolină, un stimulator al AC, care creşte nivelul de AMPc, astfel încât inhibiţia este mai uşor detectabilă. Stimularea forskolinei este măsurată în paralel (fig. 3.2). Himmler şi colab. (1993) a utilizat sisteme de teste pe bază de gene reporter cu CRE şi luciferaza pentru a investiga receptorii dopaminergici D1 şi D5 la om, ambii receptori fiind cuplaţi cu Gαs. Ei au observat o creştere a expresiei luciferazei după stimularea cu forskolin sau cu agonişti ai dopaminei.

Identificarea compuşilor agonişti sau antagonişti a fost o reuşită. Un test similar a fost aplicat pentru investigarea comportamentului de legare a diferiţilor liganzi de serotonină, receptori 5-HT1B şi receptori C1A de calcitonină [George şi colab., 1997].

De asemenea, luciferaza în asociere cu CRE este folosită în industria farmaceutică pentru realizarea unor screeninguri de mare capacitate (HTSs). Punerea în aplicare a acestui sistem a fost raportată de diferite grupuri care au stabilit teste pentru investigarea rapidă şi sensibilă a receptorilor cuplaţi cu Gi şi Gs. Testele

pentru screeningurile de mare capacitate sunt realizate de cele mai multe ori în microplăci.

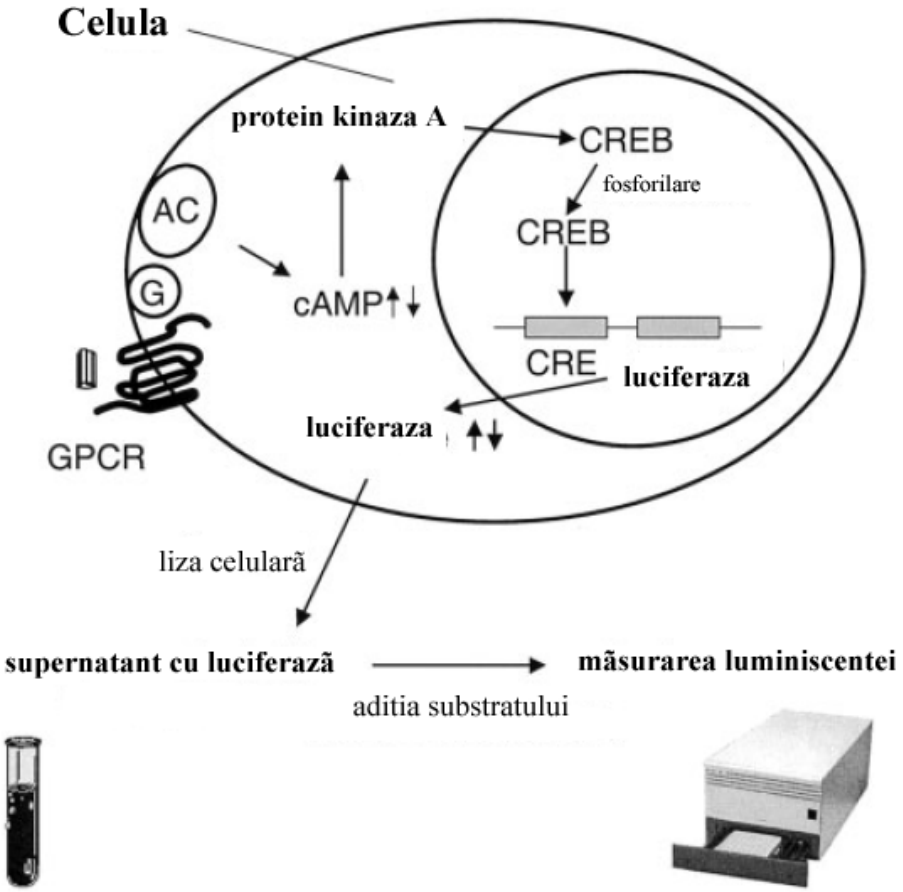


Fig. 3.2. Sisteme de teste bazate pe gene reporter ce utilizează elemente CRE şi luciferaza pentru investigarea GPCRs. Celulele ce coexprimă GPCR, cuplați fie cu Gαs, fie cu Gαi au fost incubate cu ligandul. După ce are loc stimularea sau inhibarea AC se produce o creştere sau respectiv, o scădere a AMPc. O creştere a nivelului de AMPc conduce la activarea PKA, care activează prin CREB fosforilarea. Forma fosforilată a CREB interacționează cu elemente CRE. Ulterior, este inițiată transcripția luciferazei. Pentru investigarea receptorilor cuplați cu Gαi, celulele trebuie să fie incubate cu ligandul în prezența forskolinei. Luciferaza este exprimată în citoplasmă, şi activitatea poate fi măsurată după liza celulelor şi adăugarea substratului, de exemplu luciferin luciferaza. O activitate mare a luciferazei cauzează o luminiscență puternică. Activitatea luciferazei poate fi corelată cu activitatea ligandului care activează GPCR. (AC, adenilil ciclaza; CRE, elementul de legare AMPc; CREB, proteina de legare CRE; G, proteina G.)

Cu scopul de a investiga receptorii cuplați cu Gαs, Gαi şi Gαq prin acelaşi sistem de teste, elemente CRE au fost combinate cu elemente MRE. De asemenea, acest sistem permite investigarea receptorilor cuplați cu Gαq [Fitzgerald şi colab., 1999]. Această regiune promotor poate răspunde la creşterea intracelulară de calciu, pentru a stimula PKC şi pentru a schimba nivelurile de AMPc. Răspunsul poate fi măsurat prin creşterea sau scăderea activității luciferazei, şi este util pentru

caracterizarea farmacologică a agoniştilor şi antagoniştilor. Parsons şi colab. (2000) au utilizat luciferaza firefly şi renilla în asociere cu CREs pentru investigarea receptorilor factorilor 1 şi 2 umani de eliberare a corticotropinei (CRFR1 şi CRFR2). De asemenea s-a reuşit identificarea agoniştilor şi antagoniştilor.

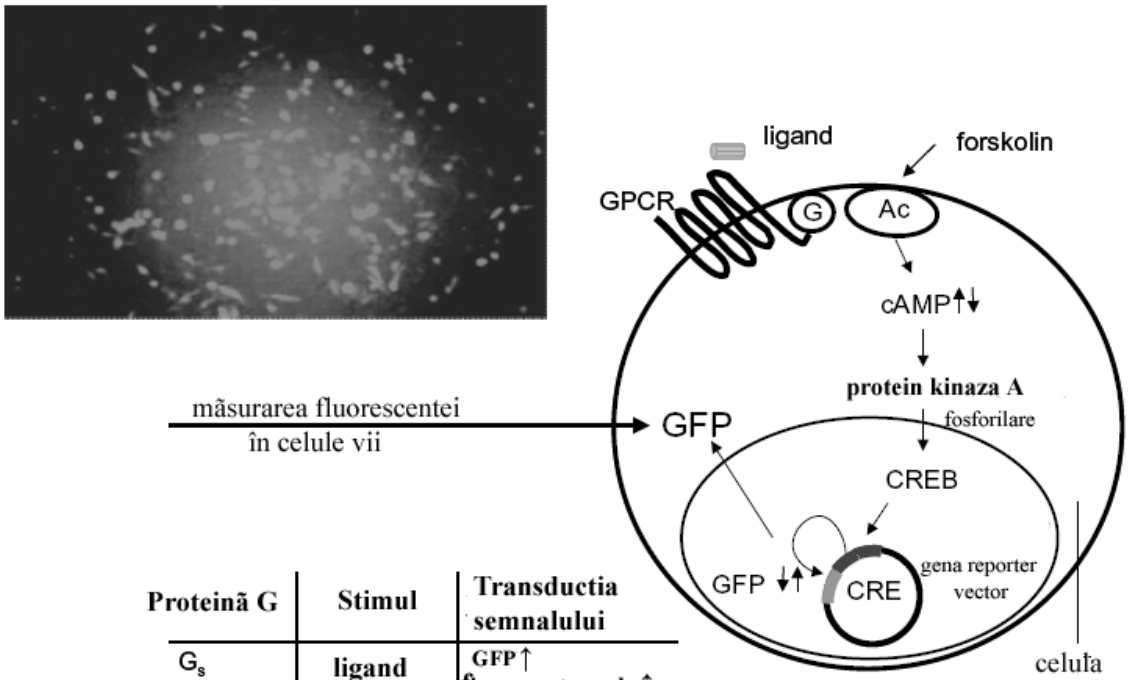
În scopul de a investiga receptorii a căror căi de transducție a semnalului modifică nivelul intracelular de AMPc sau nivelurile IP3/DAG, s-a fost folosit ca sistem pentru testele celulare o genă, luciferaza cu elemente TRE ca promotor. Acest sistem a permis caracterizarea receptorilor diferitelor neurokinine NK1, NK2 şi NK3. Mai mult decât atât, un alt sistem ce foloseşte luciferaza şi elemente TRE a fost dezvoltat pentru de screeningul liganzilor [Kotarsky şi colab., 2001]. Sistemul a fost, de asemenea, cuplat cu GFP, în scopul de a selecta celulele care exprimă stabil sistemul reporter. Aceste celule au fost folosite pentru investigarea GPCRs. Agoniştii şi antagoniştii receptorilor hormonului de eliberare a gonadotropinei (GnRH receptorii) au fost investigați cu succes, cu un sistem de teste bazat pe gene reporter pentru luciferază în combinație cu promotorul C-FOS. Receptorii GnRH sunt cuplați la calea inozitol-fosfolipid şi, după activarea receptorului, transcripția genei luciferaza este indusă de promotorul c-FOS.

3.5.2. Utilizarea altor gene reporter pentru investigarea GPCRs

De asemenea s-a raportat utilizarea β lactamazei şi SEAP pentru investigarea GPCRs. Xing şi colab. (2000) au realizat un sistem de teste bazat pe gene reporter cu β lactamaza ca genă reporter, în combinație cu promotorul NF-AT [Xing H şi colab., 2000] şi l-a folosit pentru a investiga GPCRs care sunt cuplați cu proteinele Gαq. Schimbarea concentrației mesagerului secund ar putea fi detectată prin creşterea expresiei β lactamazei. Pollok şi colab. (1999) au folosit, de asemenea, acest sistem, pentru a investiga receptorii cuplați cu proteina Gαi. Pentru a efectua aceste teste, semnalul proteinei Gαi a fost convertit în semnal de la proteină Gαq şi activitatea β lactamazei a putut fi măsurată.

Liganzi DP şi PE pentru receptorii prostanoizi GPCRs au fost caracterizați prin tehnica CRE-SEAP [Durocher şi colab., 2000]. Activarea receptorilor ar putea fi

detectată prin schimbarea nivelurilor intracelulare ale SEAP. Un dezavantaj important de măsurare a activității luciferazei şi β lactamazei îl constituie necesitatea de a pregăti extracte de celule şi de a adăuga un substrat. Aceste celule nu pot fi utilizate pentru o analiza ulterioară, iar prepararea celulelor lizate este consumatoare de timp, adiția unui substrat putând perturba sistemul celulelor sensibile. În consecință, un sistem de teste pe bază de gene reporter cu elemente CRE şi GFP ca genă reporter a fost dezvoltat pentru investigarea GPCRs pentru celule vii (fig. 3.3). Avantajul acestui sistem îl constituie faptul că adăugarea substratului nu este necesară şi nu necesită liza celulelor.



Proteină G	Stimul	Transductia semnalului
G_s	ligand	GFP↑ fluorescenta verde ↑
G_i	forskolin	GFP↑ fluorescenta verde ↑
	forskolin/ ligand	GFP ↓ fluorescenta verde↓

Fig. 3.3. Sisteme de teste bazate pe gene reporter utilizând GFP şi CREs pentru investigarea GPCRs. Cu ajutorul vectorului de genă reporter ce conține GFP şi CRE are loc transfecția în celulele care exprimă o GPCR, fie o Gαs sau Gαi cuplată. După legarea ligandului este indusă stimularea sau inhibarea AC, ceea ce determină o creştere sau o scădere a AMP. O creştere a nivelului de AMPc duce la activarea PKA care activează CREB prin fosforilare. Forma fosforilată a CREB se leagă acum la elementele CRE. În consecință, transcripția GFP este inițiată. Pentru investigarea receptorilor cuplați cu Gαi, celulele trebuie să fie incubate cu un ligand în prezența forskolinei. GFP este exprimată în citoplasmă şi poate fi măsurată în mod direct în celule în viață, folosind un cititor de fluorescență. Liza celulelor sau adiția substratului nu este necesară (AC, adenilil ciclaza; CRE, elementul de legare AMPc; CREB, proteina de legare CRE; G, proteina G; GFP, proteina verde fluorescentă)

Diferiți vectori cu gene reporter cu prezintă un număr crescut de elemente CRE (4, 8 şi 12) au fost clonați pentru stabilirea acestui sistem nou. Studiile au demonstrat că sensibilitatea acestui test a fost dependentă de numărul de CREs - vectorul cu 12 elemente CRE a furnizat cele mai semnificative date. Acest sistem poate fi, de asemenea, aplicat la celulele vii şi a fost folosit pentru investigarea receptorului NPY Y5, o Gαi cuplată cu GPCR. Receptorul NPY activat de ligand determină o scădere a nivelului de AMPc şi, în consecință, o expresie scăzută a GFP (fig. 3.3).

S-a determinat expresia dependentă de doză a neuropeptidului Y şi valoarea EC_{50} găsită a fost comparabilă cu valoarea EC_{50} obținută prin teste de competiție. Acum, un astfel de sistem este disponibil şi el ne permite efectuarea de măsurători într-o singură celulă. Pentru prima oară GFP a fost folosită ca genă reporter în teste pentru investigarea GPCR cuplați cu Gαi. În plus, noul sistem de teste bazat pe gene reporter are unele caracteristici unice, care îl fac superior oricărui alt test. Datele prezentate arată că testul este cel puțin la fel de sensibil ca testul pentru luciferază. În celulele vii, analiza este mai rapidă şi mai uşoară, fără tulburarea sensibilității sistemului celular.

În afară de investigarea GPCRs, sistemele de teste bazat pe gene reporter pot fi folosite, de asemenea pentru a investigarea căilor de transducție a semnalului. Fiecare treaptă a căii de transducție a semnalului poate fi perturbată, iar efectele pot fi uşor măsurate. Deoarece producerea de gene reporter este punctul final al unei întregi cascade de semnalizare, funcționalitatea fiecărui pas al căii de semnalizare poate fi descifrată. În plus, este posibil să se determine care reactiv poate influența calea de transducție a semnalului, iar prin utilizarea sistemului de teste bazate pe gene reporter GFP fiecare pas al semnalului de transducție poate fi cu uşurință detectat. După investigare celulele sunt încă în viață şi pot fi utilizate pentru alte analize.

În general, sistemele de teste bazate pe gene reporter sunt sisteme convenabile şi uşor de detectat pentru investigarea GPCRs (Tabelul 3.2), dar şi pentru alți receptori ca receptorii tirozin kinazici. În consecință, aceste sisteme reprezintă oportunități pentru screening-ul rapid al liganzilor şi pentru investigarea interacțiunii

receptor-ligand. Mai mult, investigarea şi caracterizarea receptorilor orfani este mult mai uşoară, iar evidențierea liganzilor lor naturali este accelerată.

Tabelul 3.2 Aplicațiile şi limitările testelor pentru genele reporter

Aplicațiile testelor de gene reporter	**Probleme şi limitări**
Identificarea agoniştilor GPCR	Aparatura sensibilă pentru măsurători
Studii farmacologice pe celulele vii	Dezvoltarea unui sistem de testare adecvat
Identificarea căilor mesagerilor secunzi de la receptor la nucleu	Transfecția celulelor
Screening de medicamente de mare capacitate	Nu toate sistemele sunt disponibile comercial
Identificarea receptorilor orfani şi a Liganzilor	

Cu toate acestea, interpretarea datelor din testele pentru genele reporter necesită unele precauții. Testele pentru genele reporter necesită o incubație de 4-6 h pentru exprimarea produsului genei reporter şi expunerea la unii agonişti ai GPCRs pentru această perioadă de timp determină desensibilizarea receptorilor şi pot induce o schimbare a valorii EC_{50}.

De asemenea expresia bazală a produsului genei reporter poate determina o serie de probleme. Pentru a înlătura acest impediment, celulele trebuie să fie investigate pentru expresia lor endogenă şi o genă reporter potrivită trebuie să fie selectată. Având în vedere că produsul genei reporter este punctul final al întregii cascade de semnalizare, există de asemenea multe posibilități pentru interferențe cu căile de semnalizare de la alte surse. De exemplu, activitatea reporterului CRE poate fi, de asemenea, activată de ser. Ligandul poate activa în aval alți componenți ai cascadei de semnalizare care pot influența citirea reporterului. Cercetatori trebuie să fie conştienți de aceste probleme care pot fi detectate prin feed-back negativ.

În concluzie, testele de gene reporter sunt instrumente valoroase pentru investigarea GPCRs. Aceste teste sunt rapide, sigure, comode, simple şi ieftine. Determinarea activității ligandului este posibilă şi aceste teste reprezintă un ajutor extraordinar în căutarea continuă de noi medicamente.

CAPITOLUL 4

DE LA GENOMUL UMAN LA NOILE MEDICAMENTE: POTENȚIALUL RECEPTORILOR ORFANI CUPLAȚI CU PROTEINELE G

4.1.Introducere

Secvențierea inițială a genomului uman, completată de Proiectul Genomului Uman şi Celera [Venter şi colab., 2001] a stimulat comunitatea biomedicală oferind numeroase oportunități pentru înțelegerea bolilor umane şi pentru dezvoltarea de terapii medicamentoase inovatoare. Funcționarea anormală a anumitor celule în unele părți ale corpului uman determină apariția unor maladii. Funcționarea celulelor este în principal reglată de o varietate de semnale chimice care sunt eliberate de către diferite tipuri de celule care controlează funcțiile organismului uman. După legarea mesagerilor chimici la receptori specifici exprimați de celulele țintă, receptorii vor fi activați şi vor inția diferite semnale în celule, determinând modificări în funcționarea lor. Medicamentele afectează funcția celulară prin interacțiunea cu receptorul, mimând sau blocând legarea receptorului de ligand şi, prin urmare, controlând procesul bolii. În acest capitol, pentru a înțelege importanța secvențializării genomului uman în descoperirea medicamentelor, ne vom focaliza pe producerea medicamentelor legate de receptorii cuplați cu proteina G (GPCRs).

Programele pentru descoperirea medicamentelor, a mai multor companii farmaceutice, s-au concentrat asupra superfamiliei GPCR. De ce ? pentru că aceşti receptori sunt o clasă foarte utilă pentru țintele medicamentelor şi aproximativ 50% dintre produsele farmaceutice comercializate în prezent au ca țintă GPCRs. În multe boli, GPCRs sunt cunoscuți sub numele de "ținte validate", de exemplu liganzii ce interacționează cu GPCR sunt cunoscuți pentru că pot induce anumite boli la om. În tabelul 4.1. se prezintă câteva exemple de medicamente ce au țintă GPCRs şi se subliniază importanța şi frecvența utilizării lor.

Analiza bioinformatică a secvențelor genomului uman a evidențiat mai multe sute de noi membri ai familiei GPCR. Cum GPCRs este una dintre cele mai importante familii țintă pentru descoperirea medicamentelor în industria farmaceutică, este de aşteptat ca diferiți receptori noi identificați să ofere un potențial similar şi de asemenea să se dovedească că sunt ținte bune pentru medicamente [Jensen şi colab., 2001]. Aici, vom trece în revistă etapele care în cele din urmă, traduc gene umane identificate ce codifică GPCR pentru medicamente țintă validate.

Tabelul 4.1 Principalele medicamente care au drept țintă GPCRs

GPCR țintă	Terapie	Indicație	Subtip GPCR
Receptor pentru acetilcolină	Diciclomin (Bemote)	Sindrom de intestin iritabil	Antagonist M1
	Ipratropium (Atrovent)	COPD	Antagonist M3
	Tiotropium (Spiriva)	COPD	Antagonist M1/M3
Adrenoreceptor	Atenolol (Tenormin)	Hipertensiune	Antagonist β1
	Timolol (Timuptol, Inderal)	Glaucom/Hipertensiune	Antagonişti β amestecați
	Salmeterol (Albuterol)	Astm	Agonist β2
	Albuterol (Ventolin)	Astm	Agonist β2
	Doxazosin (Cardura)	Hipertrofie de prostată Antihipertensiv	Antagonist α1
	Carvedilol (Coreg)	Insuficiență cardiacă congestivă, Antihipertensiv	β1/β2/α1
	Clonidina	Antihipertensiv	Agonist α2
	Propranolol (Inderal)	Antiaritmic, antihipertensiv, angină, anxietate	Antagonist β
	Terazosin (Hytrin)	Hipertrofie de prostată Antihipertensiv	Antagonist α1
Receptorul angiotensinei II	Losartan (Cozaar)	Hipertensiune	Antagonist AT1
	Eprosartan (Teveten)	Hipertensiune	Antagonist AT1
Receptor pentru histamină	Cetirizină, Loratadină	Alergii	Antagonist H1
	Cimetidină, Ranitidină	Ulcere	Antagonist H2
Receptorul pentru leukotriene	Pranlukast (Onon)	Astm, rinite alergice	Antagonist CysLTR1
	Zafirlukast (Accolat)	Astm	Antagonist CysLTR1
Receptor opioid	Buprenorfină	Analgezic narcotic, combaterea durerii	Agonist μ/antagonist κ
	Butorfanol	Analgezic narcotic, combaterea durerii	Agonist μ/antagonistκ
	Alfentanil (Alfenta)	Analgezic narcotic, combaterea durerii	Agonist μ
	Morfină (Roxanol)	Analgezic narcotic, combaterea durerii	Agonist μ

Receptor prostanoid	Epoprostenol (Flolan) Misoprostol (Cytotec)	Hipertensiune pulmonară primară Ulcere	Agonist al receptorului pentru prostaciclină Agonist al receptorului pentru prostaglandină
Somatostatin	Octreotid (Sandostatin)	Boli abdominale, tumori intestinale	Agonist sst2 şi sst5
Receptor pentru serotonină	Sumatriptan (Imitrex) Buspironă (Buspar) Olanzapină (Zyprexa) Ritanserin (Tisterton) Cisaprid (Prepulsic) Trazodonă (Desyrel) Clozapină (Leponex)	Migrenă Anxietate Psihoze Antidepresiv Arsuri gastroesofagiene nocturne Antidepresiv Schizofrenie	Agonist 5HT1B/1D Agonist 5HT1A Antagonist 5HT2/D2 Antagonist 5HT2 Agonist 5HT4 Amestec antagonişti 5HT2
Receptorul factorului de eliberare al gonadotropinei	Goserelin (Zoladex)	Cancer	Agonist GnRHR/LHRHR
Receptor pentru dopamină	Ropinerol (Requip)	Boala Parkinson	Agonişti D2, D3, D4

4.2. GPCRs şi genomul uman

4.2.1. Arhitectura GPCR , semnalizarea şi acțiunea medicamentelor

GPCRs formează cea de-a patra familie de proteine în genomul uman [Venter şi colab., 2001], şi joacă un rol important în multe procese fiziologice şi patofiziologice. Familia cuprinde un număr mare (mai mult de 1000) de proteine transmembranare ce prezintă o arhitectură similară: un domeniu extracelular N-terminal, trei bucle extracelulare şi trei bucle intracelulare, şapte helixuri transmembrane care se conectează la buclele extra şi intracelulare. Datorită prezenței celor 7 domenii transmembranare aceşti receptori au fost denumiți „şerpuitori“ din cauza asemănarii lor cu un şarpe spiralat, în mişcare. Ei conțin un situs extracelular de legare a ligandului, important pentru activarea lor diferențiată, precum şi domenii intracelulare de cuplare la proteine, cum ar fi proteinele G. Deşi GPCRs formează o familie înrudită de receptori transmembranari, aceştia au tendința de a fi activați selectiv de un set foarte divers de liganzi, incluzând amine biogene, peptide, lipide analoage, nucleotide, aminoacizi derivați, Ca^{2+}, stimuli senzoriali, cum ar fi lumina

(fotoni), gustul şi mirosul (fig. 4.1). În consecință, superfamilia de GPCRs poate fi împărțită în mai multe subgrupuri, cum ar fi familia rodopsinei (familia A), familia receptorilor asemănători celor pentru secretină (familia B) şi familia receptorilor pentru glutamatul metabotropic (familia C). Diverse familii GPCR reflectă diferite elemente structurale, care permit receptorilor să lege diverşi liganzi.

Acestă specificitate mare pentru recunoaşterea liganzilor este, de asemenea, valorificată de la liganzii țintă exogeni (medicamente) la proteinele GPCR specifice, explicând de ce GPCRs au un succes aşa de mare ca medicamente țintă. Mai mult decât atât, GPCRs sunt relativ răspunzători pentru dezvoltarea medicamentelor datorită localizării lor transmembranare, facilitând nevoia medicamentelor de a intra în celule pentru a fi eficiente.

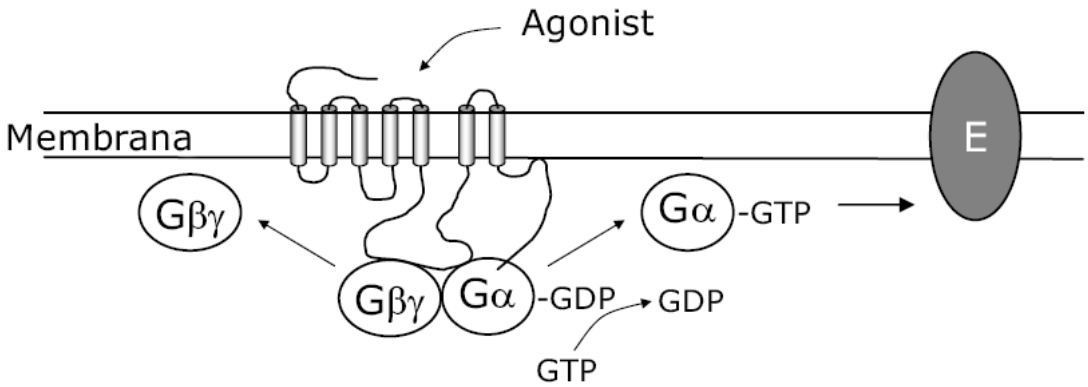


Fig. 4.1. Semnalizarea prin GPCR. GPCR sunt alcătuiți dintr-un domeniu extracelular N-terminal, trei bucle extracelulare şi trei bucle intracelulare, care sunt conectate prin şapte domenii helicoidale transmembranare. GPCR este situat la nivelul membranei plasmatice şi poate fi activat prin liganzi extracelulari. Activarea receptorilor are ca rezultat activarea intracelulară a proteinelor G heterotrimerice prin promovarea şi favorizarea schimbării GDP-GTP la nivelul subunității Gα. Odată cu activarea proteinei G heterotrimerice, proteina G se disociază în subunitățile Gα şi Gαγ, care pot activa proteine (E) efectoare în celule pentru a genera mesageri secunzi.

Odată cu recunoaşterea moleculei de semnalizare extracelulară, o schimbare conformațională determină proteinele G heterotrimerice intracelulare să moduleze în aval o varietate de căi biochimice [Jensen şi colab., 2001]. GPCR este în echilibru între două (sau mai multe) stări diferite: o stare inactivă şi o stare activă [Kenakin, 2002]. În stare activă, GPCR este capabil să se cupleze la proteina G, pentru a produce un răspuns biologic. În starea inactivă, receptorul nu este în măsură să producă un răspuns biologic. Legarea moleculelor care activează GPCR (agonişti)

schimbă echilibru, astfel că GPCR este stabilizat în starea activă. Multe dintre medicamentele existente pe piață în 2009 acționează asupra funcției GPCRs, împiedicând acțiunea moleculelor de semnalizare endogene ce au țintă GPCR. Aceşti liganzi, cunoscuți anterior sub denumirea de antagonişti, pot fi clasificați acum ca „agonişti inverşi“, care, stabilizează GPCR într-o conformație inactivă, şi „antagonişti neutri“, care nu schimbă echilibrul conformațional, dar împiedică interacțiunea cu agoniştii endogeni prin legarea la GPCR.

4.2.2. Identificarea GPCRs

Se consideră că cele şapte domenii structurale transmembranare rezultă din structuri foarte bine conservate. În timpul anilor 1980, tehnologia ADN-ului recombinant a fost introdusă în neuroştiințe, amplificând descoperirea receptorilor şi a genelor ce codifică peptide/proteine ligand. Purificarea şi, ulterior, clonarea în 1986 a genei receptor β2 la hamster [Dixon,1986] poate fi apreciată ca un reper, în acest domeniu. S-a evidențiat ca punct comun, cele şapte structuri transmembranare GPCR şi o secvență ADN similară în regiunile transmembranare cu rodopsina bovinelor (primul GPCR care a fost clonat). Omologia de secvență între ambii GPCRs a permis clonarea multor GPCRs între anii 1980-1990, pe baza omologiei. Pentru a identifica secvențe GPCR înrudite au fost utilizate, fie screening-ul prin hibridizare mai puțin rigurosă, fie reacția de polimerizare în lanț degenerată(PCR). Această abordare a condus la un număr mare de GPCRs pentru care liganzii nativi au fost inițial necunoscuți. Cu toate acestea, alinierea secvențelor relativ simplă a permis previziuni rezonabile despre liganzi pentru un număr de receptori orfani clonați mai devreme. Inițial, identificarea noilor medicamente țintă au fost axate în principal pe testarea liganzilor endogeni împotriva receptorilor puternic înrudiți. Această abordare a condus la identificarea a numeroase subtipuri de receptori. Primul GPCR „deorfanizat“ a fost receptorul pentru 5-hidroxitriptamină $(HT)_{1A}$ care a fost clonat pe baza omologiei de secvență înrudită cu a receptorului β2 [Fargin, 1988], apărut pentru a răspunde la serotonină. Cu toate acestea, modul de abordare nu a constituit întotdeauna un succes, deoarece depindea de identitatea aminoacizilor din receptori

deja identificați. Timp de mai mulți ani diverse grupuri academice şi industriale au încercat, de exemplu, să cloneze receptorul pentru histamina H3, care este definit farmacologic. În ciuda disponibilității genelor ce codifică receptorii umani H1 şi H2, încă de la începutul anilor 1990, pana în 1999 clonarea nu a reuşit. Dar, Lovenberg şi colab., (1999) au reuşit în cele din urmă să cloneze gena receptorului uman H3 histaminic folosind informații din baza de date Incyte referitor la expresia secvențelor scurte.

Analiza filogenetică indică faptul că, gena ce codifică receptorul uman H3 nu este strâns legată de genele care codifică receptorii umani H1 sau H2 (omologia totală este de aproximativ 22%); de fapt, gena receptorului H3 seamănă mai mult cu genele care codifică α_2 adrenoreceptorii. Aceste trei gene diferite ale receptorilor pentru histamină, au evoluat de la diferiți strămoşi şi se pare că toate cele trei au dobândit elemente de o importanță deosebită pentru recunoaşterea de către histamină. Asemănarea slabă a genei receptorului H3 cu genele ce codifică alte două subtipuri de receptori pentru histamină explică de ce nu au reuşit diferite abordări bazate pe omologie pentru clonarea genei receptorului H3 [Leurs şi colab., 2000].

Succesul clonării genei receptorului H3 a fost urmat imediat de clonarea genei ce codifică receptorul H4 pentru histamină, pentru care au fost disponibile puține dovezi farmacologice. Gena receptorului H4 a fost clonată de mai multe grupuri, concomitent, pe baza secvenței receptorului H3, care a devenit disponibilă [Liu şi colab., 2001]. Noul receptor pentru histamină prezintă o exprimare foarte restrânsă în sistemul imunitar şi în prezent este considerat ca o potențială țintă pentru medicamente în condiții inflamatorii.

4.2.3. GPCRs în era postgenomică: receptorii orfani

Pe baza informațiilor disponibile despre genomul uman, numai o analiză sistemică a genomului GPCR uman printr-o abordare genomică funcțională, va permite descoperirea de noi medicamente țintă. Pentru a descoperi noi GPCRs în genom sunt utilizate secvențe motiv foarte conservate cum ar fi cele şapte domenii transmembranare care sunt comune la toți GPCRs. O astfel de utilizare a

bioinformaticii a permis identificarea *in silico* a multor secvențe de ADN ce codifică GPCRs umani validați. Deşi genomul complet a fost secvențializat, numărul total de GPCRs nu este încă pe deplin stabilit. Se consideră că numărul total de GPCRs în genomul uman variază de la 1000 până la 2000. Progrese recente în cercetarea genomului au relevat un total de circa 300 GPCRs, care prezintă valoare farmaceutică ca ținte potențiale pentru medicamente [Civelli şi colab., 2001]. Dintre aceştia, 160 GPCRs sunt activați de 97 transmițători cunoscuți, incluzând amine biogene, aminoacizi, peptide, nucleotide, acizi graşi derivați şi polipeptide. Cu toate acestea, aproximativ 140 din aceşti noi GPCRs nu leagă orice ligand endogen cunoscut şi oferă noi oportunități interesante pentru descoperirea de medicamente care vizează aceste aşa-numiții „GPCRs orfani“ (oGPCRs) - GPCRs a căror funcție şi liganzi sunt încă necunoscuți.

În plus față de aceşti GPCRs de origine umană, agenții patogeni pot purta gene ce codifică GPCR care pot fi exprimate la gazdă. De exemplu, virusul herpesului uman Karposi asociat (HHV-8), codifică ORF74, un receptor foarte activ, care se consideră că joacă un rol important în dezvoltarea bolii [Cesarman şi colab., 2000]. De asemenea, citomegalovirusul uman (CMV) codifică patru GPCRs în genomul său. Unul dintre GPCRs codificați de CMV uman, US28, este extrem de activ [Casarosa şi colab., 2001], având un rol important în dezvoltarea aterosclerozei şi, după ultimele descoperiri ale agoniştilor inverşi nonpeptidergici, aceşti receptori ar putea constitui posibile ținte pentru medicamente.

Având în vedere că există un număr mare de GPCRs „nețintiți“, în prezent numeroase companii cu profil farmaceutic/biotehnologic dar şi laboratoare academice, fac eforturi pentru identificarea liganzilor pentru receptorii existenți şi cei nou descoperiți. Programele de cercetare ale multor companii de medicamente includ strategii care încearcă să exploateze Proiectul Genomului Uman pentru a avea acces la noi familii de GPCR, inclusiv oGPCRs, pentru a obține noi medicamente. Pentru a „deorfaniza“ oGPCRs se impune identificarea liganzilor endogeni naturali sau nativi pentru aceşti receptori. Funcțiile acestor noi receptorii sunt elucidate folosind abordări de genomică funcțională. Căutarea liganzilor pentru receptorii orfani poate

implica metode clasice de screening, cum ar fi monitorizarea schimbărilor de nivel ale mesagerilor secunzi bine-cunoscuți, cum ar fi AMPc şi Ca^{2+}, sau poate implica tehnologii foarte sofisticate care sunt în mare parte bazate pe o înțelegere profundă a biologiei care este implicată în procesul de activare a receptorilor, pe mai multe niveluri bazate pe cercetările de biologie moleculară, metode de calcul şi bioinformatică, microfluide şi nanotehnologii, etc. Ca atare, deorfanizarea receptorilor a devenit cu adevărat o abordare multidisciplinară, şi în următoarele secțiuni vom indica în ce măsură cunoştiințele fundamentale de bioinformatică, exprimarea receptorilor şi sistemele de traducere a semnalului sunt exploatate pentru identificarea liganzilor pentru oGPCRs.

4.3. Investigarea liganzilor

4.3.1. Abordări de farmacologie inversă pentru oGPCRs

Istoric, conceptul de receptori a fost dezvoltat pe baza efectelor biologice observate ale medicamentelor administrate exogen. Mulți receptori şi subtipuri de receptori pentru mesageri chimici endogeni cunoscuți au fost descoperiți prin investigarea acțiunii moleculelor biologic active. Dezvoltarea domeniului de farmacologie moleculară bazată pe conceptele de receptor timpuriu a optimizat drumul spre designul rațional de medicamente, pe baza interacțiunii dovedite cu un sistem receptor cunoscut. Modul de acțiune al medicamentelor a relevat existența unui sistem receptor care a fost „exploatat chimic“. Acest proces a condus la descoperirea mai multor medicamente importante din ziua de astăzi şi reprezintă, încă, o abordare utilă pentru sistemele receptor cunoscute.

Cu toate acestea, situația este foarte diferită cu oGPCRs. Cunoştințele despre moleculele endogene de semnalizare sunt deficitare. Mai mult decât atât, este foarte dificil să se prevadă în prealabil potențialul liganzilor specifici, care acționează „la alegere“ cu oGPCR. Prin urmare, procesul de identificare a liganzilor endogeni pentru receptorul orfan este numit „farmacologie inversă“. Mai întâi trebuie să se stabilească ligandul endogen pentru oGPCR, apoi trebuie să se investigheze funcția perechii oGPCR - ligand în procese fiziologice, în cazul în care, după potențialele

medicamente țintă, oGPCR ar putea fi dezvoltat. Deşi farmacologia inversă este o abordare necesară şi cu un grad de risc ridicat, rezultatele finale în procesul pentru descoperirea medicamentelor sunt, de obicei, extrem de avantajoase. Mai mult decât atât, în ultimii ani, evoluțiile tehnologice şi creşterea înțelegerii funcției GPCR au contribuit la dezvoltarea unor strategii de succes.

4.3.2. Abordări *in silico*

Bazele de date pot fi folosite pentru a obține informații cu privire la relațiile filogenetice, expresia țesutului, existența unor " variante polimorfice "şi potențiala legare de un anumit fenotip în vederea identificării unui oGPCR *in silico*. Analiza filogenetică a secvențelor GPCR poate dezvălui relația oGPCR cu alți receptori deja cunoscuți şi poate fi folosită ca un instrument pentru predicția clasei liganzilor pentru receptorii orfani [Joost şi colab., 2002]. De exemplu pentru receptorii H_4 pentru histamină, o analiză filogenetică a secvenței receptorilor H_4 corespunde în mod clar cu a receptorilor H_3 pentru histamină (fig. 4.2).

În prezent, foarte multe date despre aranjamentul genelor şi analiza lor atentă ne va permite să obținem informații importante despre expresia genelor *in silico.* Pentru a evalua potențialul unui oGPCR pentru aplicații terapeutice, o cunoaştere detaliată a expresiei țesutului este de cea mai mare importanță. Dacă cineva este interesat să sintetizeze medicamente împotriva tulburărilor sistemului nervos central, nu va fi interesat doar de oGPCRs care sunt exprimați la periferie. De asemenea informații cu privire la expresia țesutului sunt foarte importante pentru „căutarea“ de liganzi endogeni.

Disponibilitatea secvenței genomului uman, precum şi a altor specii cum ar fi şoarecii permite analiza largă a genomului; de exemplu, polimorfismul unui singur nucleotid (SNPs) care poate fi legat de un anumit fenotip,va permite cunoaşterea funcției unei anumite gene şi a proteinei codificate. Analiza la nivel de genom aduce un avans important în înțelegerea funcției genei şi a rolului ei în producerea bolii. O astfel de abordare de genomică funcțională a fost aplicată cu succes pentru identificarea genei PTC ce codifică un GPCR sensibil la feniltiocarbamid , care este

responsabil pentru gustul sensibil la feniltiocarbamidă. Mai multe SNPs în această genă determină pierderea sensibilității gustului [Kim şi colab., 2003].

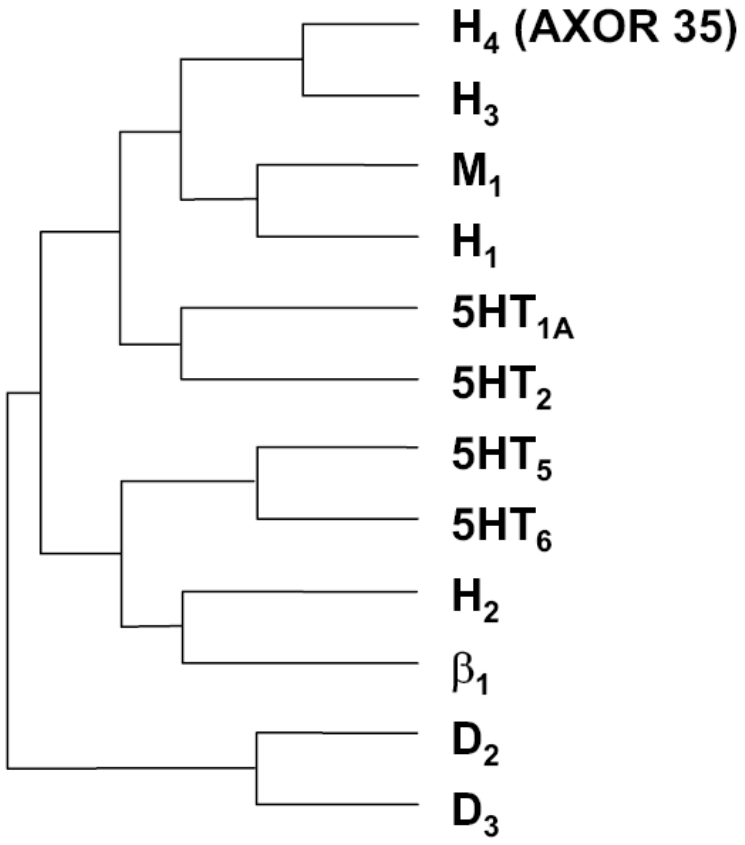


Fig. 4.2 . Analiza arborelui filogenetic a mai multor GPCRs aminergici plasează AXOR 35 aproape de receptorul H3 pentru histamină. Analiza farmacologică ulterioară a confirmat că AXOR 35 reprezintă un nou receptor uman pentru histamină, receptorul H4 (după Dingermann şi colab., 2004).

Alternativ, generarea de şoareci în care expresia unui anumit GPCR a fost eliminată prin manipulare genetică (receptori „knock-out“) poate furniza indicii pentru potențialul rol fiziologic al receptorilor. În cazul în care un anumit ligand este codificat de genom, cum este cazul liganzilor peptidergici, poate fi de asemenea generat knockout, dacă un anumit trasmițător lipseşte. Prin urmare, fenotipul knock-out potențial poate aduce indicii cheie pentru funcția receptorului şi ajută la validarea unui GPCR ca un potențial medicament țintă [Zambrowicz şi colab., 2003].

Knockout-ul receptorilor legați de densitate, de exemplu, a demonstrat că aceşti oGPCR sunt implicați în remodelarea vasculară.

Dicționarul Deltagen şi de Genetică, oferă în prezent tehnologii de knockout la mamifere *in vivo* de mare capacitate pentru a genera diferiți şoareci knockout (inclusiv diferiți GPCR knockout) şi analiza lor fenotipică [Abuin şi colab., 2002]. Accesul la baze de date relevante (comerciale) permite obținerea de informații cu privire la potențialul rol al oGPCR în fiziologie.

4.3.3. Expresia tisulară

După cum s-a menționat anterior, cunoaşterea expresiei tisulare a oGPCR este unul dintre primii paşi care decide dacă oGPCR este cu adevărat de interes terapeutic. În plus față de abordările *in silico*, există diverse alte mijloacele necesare pentru a obține date privind exprimarea tisulară a oGPCR. Cele mai populare tehnici pentru profilul tisular au fost analiza expresiei ARNm prin analiza Northern blot, revers transcripția RT-PCR sau hibridizarea *in situ*.

În analiza Northern blot, ARNm din diferite țesuturi este separat în funcție de mărime prin electroforeză în gel, transferat şi imobilizat pe membrane de nitroceluloză sau nylon, şi incubat cu oligonucleotide radioactive sau fluorescente marcate sau sonde de ADNc, care se bazează pe secvența ADNului, oGPCR de interes. Prin intermediul asocierii cunoscute a bazelor perechi specifice moleculelor de ADN şi ARN, hibridizarea sondelor se va produce doar cu moleculele ARNm al oGPCR. Analiza semnalului radioactiv sau fluorescent ce rămâne pe plăci după spălare ne permite să deducem expresia tisulară. Alternativ, prin efectuarea de spălări mai puțin stricte, (screening prin hibridizare mai puțin riguroasă), sonda poate hibridiza cu molecule ARN codificatoare pentru noi GPCRs care prezintă suficiente secvențe omoloage cu sonda. În prezent, bloturi cu diferite țesuturi umane pot fi obținute comercial.

De asemenea expresia ARNm tisulară poate fi obținută printr-o variantă a tehnicii PCR. Utilizând enzima revers transcriptaza, ARNm de la nivelul țesutului este transcris în ADNc, unde apoi moleculele de ADNc din oGPCR sunt amplificate printr-o reacție PCR cu două oligonucleotide specifice oGPCR.

Datele cele mai detaliate despre expresia ARNm pot fi obținute prin hibridizare *in situ*. Fragmentele de țesut sunt incubate în condiții adecvate cu oligonucleotide radioactiv sau fluorescent marcate sau sonde ADN, care se bazează pe secvența ADN a oGPCR de interes. După spălare, citirea oferă informații detaliate cu privire la variațiile nivelurilor expresiei în țesuturi complexe, cum ar fi creierul.

Cum expresia ARNm nu reflectă real expresia proteinei, poate că ar trebui încercat să se măsoare nivelurile de expresie a proteinelor în loc de expresia ARNm. Cu toate acestea, pentru profilul expresiei proteinelor este nevoie de un anumit anticorp pentru analiza Western blot sau analiza imunohistochimică. Deşi generarea de anticorpi pentru oGPCRs nu este imposibilă, deseori necesită resurse substanțiale şi de aceea nu este foarte atractivă.

Informațiile despre expresia GPCR sunt fundamentale pentru întregul proces de farmacologie inversă, abordări anatomice moleculare la scară mare, cartografierea nivelului expresiei (profilul expresiei) tuturor GPCRs cunoscuți, inclusiv a receptorilor orfani, permițând descoperirea timpurie a acelor GPCRs care se pot dovedi utili în descoperirea medicamentelor.

4.3.4 .Expresia oGPCR de interes

Pentru a identifica ligandul endogen pentru un oGPCR de interes, trebuie stabilizate liniile celulare care exprimă receptori orfani şi folosirea acestor linii celulare pentru screening-ul potențialilor liganzi. Multe linii de celule de mamifere sunt în prezent disponibile pentru aşa numita „expresie heterologă“ a oGPCRs. Pentru a exprima un oGPCR de interes, secvența ADNc a oGPCR este mai întâi clonată dintr-un țesut relevant sau ADNul genomic, un *epitop tag*, cum ar fi un FLAG, c-myc, V5 sau hemaglutinin este adesea încorporat în domeniu N-terminal al receptorilor, pentru a permite detectarea proteinelor receptor de la suprafața celulelor folosind anticorpi îndreptați împotriva epitopilor tag. ADNc al oGPCR se inserează în vectori ADN speciali, care sunt transferați („transfecție“) în celule mamiferelor (fig. 4.3). O varietate de tehnici (transfecția chimică, electropermeabilizarea, utilizarea tehnicilor de infecție şi lipofecție, de exemplu, baculovirusul, adenovirusul

sau Virusul Semliki Forest) sunt disponibile în prezent, pentru a transfera în mod eficient ADN-ul într-o varietate de celule. Exemple de linii de celule frecvent utilizate pentru exprimarea GPCRs includ celulele HEK 293 (human embryonic kidney) şi celulele CHO (Chinese hamster ovary).

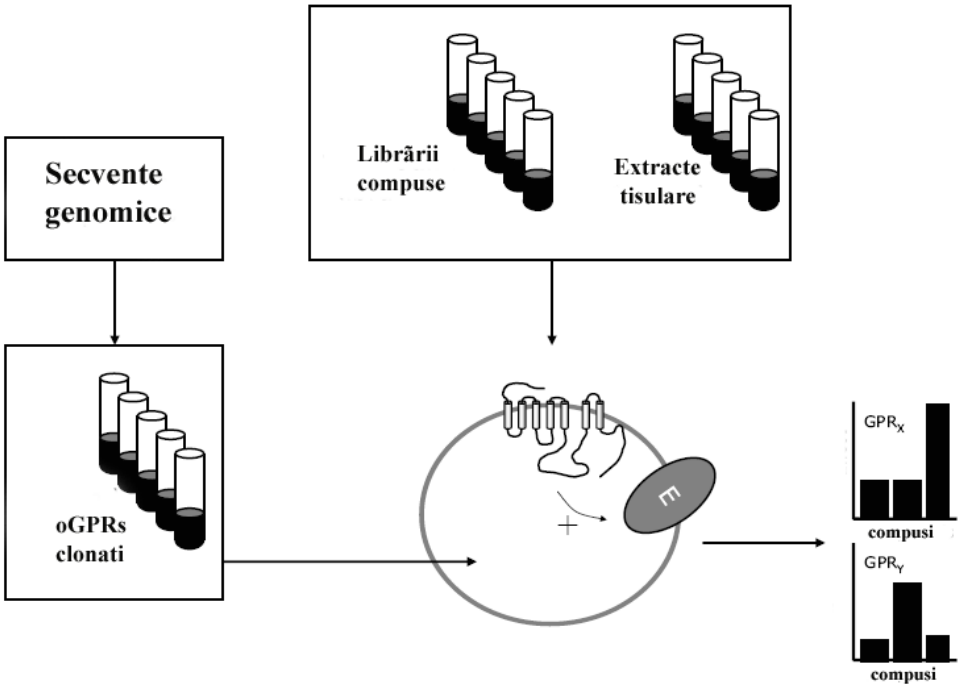


Fig. 4.3. ADNc ce codifică GPCRs proveniţi din genom sunt clonaţi în vectori de expresie adecvaţi cu scopul de a obţine o expresie adecvată a receptorului în celulele utilizate în procesele de identificare a liganzilor. În cazul în care celulele exprimă receptorii de interes, celule pot fi stimulate prin liganzi care pot fi obţinuţi din biblioteci compuse sau extracte tisulare şi celulele sunt apoi monitorizate de exemplu, pentru schimbări în activitatea celulară prin efectuarea de teste funcţionale (a se vedea secţiunea 4.3.5). Prin repetarea acestei strategii, GPCRs pot să inducă răspunsuri specifice pentru anumite perechi GPCR-ligand .

De obicei, transfecţia genelor GPCR, în aceste celule, are ca rezultat niveluri de expresie relativ înalte, care facilitează întreg procesul de farmacologie inversă. Trebuie luate precauţii în ceea ce priveşte potenţialele interferenţe cu sistemul de screening al GPCRs exprimate endogen de celulele gazdă. Dimpotrivă, s-ar putea foarte bine ca aceste sisteme de exprimare să nu prevadă condiţii corespunzătoare celulare în ceea ce priveşte expresia proteinei G sau, poate mai surprinzător, sunt exemple ale asocierii proteinelor modificatoare ale activităţii receptorilor (RAMPs) cu GPCR şi formarea de GPCRs heterodimerici care sunt importanţi pentru formarea

de GPCR complet funcționabili [Sexton şi colab., 2001]. În plus față de această mare varietate de linii celulare de mamifere, câteva linii celulare care nu sunt de mamifere, incluzând celule de insecte, de *Xenopus laevis* broasca pigmentată şi de drojdie de bere sunt, de asemenea, folosite pentru expresia heteroloagă şi caracterizare a GPCRs, inclusiv identificarea de liganzi nativi şi surogat [Brown şi colab., 2002] potențiali pentru oGPCRs. Un important avantaj al sistemului de expresie al drojdiei este setul limitat de proteine G native şi GPCRs din drojdia de bere.

4.3.5 . Abordări de screening

Există două strategii de pornire în identificarea liganzilor nativi pentru receptori orfani. Prima foloseşte țesuturi native în care este exprimat un receptor. Prezența receptorilor care oferă un anumit situs de legare al ligandului în anumite țesuturi şi, care odată cu legarea ligandului, induce răspunsuri funcționale ce nu sunt mediate prin oricare dintre GPCRs cunoscuți capabili să lege liganzi înrudiți sugerează existența de GPCRs suplimentari. Astfel, un ligand identificat este legat la un receptor neidentificat. Acesta a fost cazul pentru nocistatin, un ligand de natură peptidică derivat din acelaşi precursor ca nociceptinul, ligandul endogen pentru receptorul 1 pentru opiozi [Klein şi colab., 1998]. Un alt exemplu de oGPCR, care a fost deorfanizat în acest mod este Bonzo coreceptorul HIV ca receptor de chemokine CXCL16 (CXCR6) [Matloubian şi colab., 2000]. Prima căutare în baza de date EST, a identificat CXCL16 ca fiind un potențial nou ligand pentru receptorul pentru chemokine legat de membrană.

Studiile ulterioare au evidențiat tipuri de celule specifice care leagă celule ce exprimă CXCL16. O abordare în ceea ce priveşte clonarea expresiei a fost apoi folosită cu succes pentru a identifica un receptor pentru CXCL16. O bibliotecă de expresie de ADNc cu ARNm, a fost făcută din celulele CXCL16-legate şi transfectate în celule HEK293, care au fost apoi evaluate pentru CXCL16 legate prin analiza FACS. În cele din urmă, clonele de ADNc individual au fost identificate astfel că, atunci când sunt exprimate în celule HEK293, au arătat o legare puternic specifică de CXCL16. Secvențierea completă a ADNc a dezvăluit identitatea CXCR6.

De obicei, atunci când s-a încercat să se identifice un ligand pentru un oGPCR, cercetătorii au stabilizat linii de celule care exprimă oGPCR şi apoi au folosit acest sistem artificial pentru screening-ul potențialilor liganzi. Într-o astfel de strategie complexă(a doua) genetică şi chimică, celulele ce exprimă oGPCR sunt utilizate ca vehicule în identificarea moleculelor țintă mici.

Apoi, celulele care exprimă receptorul de interes pot fi utilizate fie pentru teste de legare a radioligandului (teste non-funcționale) sau teste funcționale, care implică măsurarea răspunsurilor celulare care pot să apară odată cu activarea receptorilor. Datorită necesității de ligand marcat radioactiv, abordările de legare a radioligandului sunt mai puțin utile pentru receptorii deorfanizați, cu excepția cazului în care există o şansă bună ca receptorul orfan să aibă o omologie ridicată cu un GPCR existent, pentru care este disponibilă o afinitate crescută a liganzilor.

Această abordare a constituit un succes pentru deorfanizarea, de exemplu, a receptorilor pentru α-laurotoxină [Ichtchenko K. şi colab., 1999] şi poate ajuta deorfanizarea receptorilor prin confirmarea legării ligandului identificat de receptor. Cu toate acestea, testele funcționale sunt de multe ori esențiale pentru identificarea liganzilor nativi pentru oGPCRs.

Pentru identificarea liganzilor nativi pentru receptorii orfani, folosind teste funcționale, diverse biblioteci ce conțin colecții mari de potențiali liganzi endogeni sunt concentrate pe răspunsurile lor biologice în celule care exprimă receptorul. Astfel de biblioteci compuse pot cuprinde mulți dintre agoniştii cunoscuți care sunt disponibili, inclusiv peptide noi, care pot fi identificate pe bază de analiză bioinformatică a genelor ce codifică peptide validate.

În cazul în care nu se obțin rezultatele aşteptate de la aceşti agonişti GPCR cunoscuți sau validați, o căutare de liganzi noi poate fi apoi inițiată prin screening în ciuda extractelor biologice ale țesuturilor în care oGPCR sunt cunoscuți a fi exprimați, la fel pentru fluide şi supernatantul celular.

4.4. Screeningul pentru liganzi oGPCR folosind teste funcționale

Răspunsul fiziologic care este observat în urma activării GPCR este de cele mai multe ori reglat de cuplarea şi de activarea proteinelor G de către receptori activați. GPCRs se cuplează la mecanismele cascadei de semnalizare prin mesageri secunzi pe calea proteinelor heterotrimerice. Cele mai multe teste clasice funcționale folosite pentru a măsura activitatea GPCR sunt de obicei bazate pe măsurarea fie a proteinei G, fie a activării efectorilor. De obicei screening-ul pentru liganzii oGPCRs este efectuat prin mijloace de exploatare a biologiei sistemelor receptorilor, şi poate implica metodele clasice de depistare, cum ar fi monitorizarea schimbărilor nivelurilor mesagerilor secunzi bine cunoscuți (AMPc şi Ca^{2+}) sau poate implica tehnologii foarte sofisticate care se bazează în mare parte pe o profundă înțelegere a biologiei, care este implicată în activarea mediată de receptori a cascadelor de transducție a semnalui.

Aceste noi teste de screening de mare capacitate (HTS) utilizează automatizarea şi miniaturizarea, şi pot fi efectuate mai repede şi mai eficient decât tehnicile de screening pentru descoperirea medicamentelor tradiționale. La acestea se adaugă tehnici de analiză şi utilizarea sistemelor de teste convenabile pentru identificarea liganzilor pentru oGPCRs. Tabelul 4.2. prezintă câțiva dintre oGPCRs care au fost împerecheați cu ligandul lor nativ în ultimii ani. După ce astfel de perechi receptor-ligand sunt identificate, testele HTS pot fi axate pe găsirea potențialului terapeutic pentru aceste noi ținte. În continuare vom evidenția diversele abordări experimentale care au fost dezvoltate pentru funcționarea screening-ului pentru oGPCRs. În unele cazuri metodologia va fi evidențiată prin succesul deorfanizării oGPCRs specifici.

4.4.1. Teste de legare GTPγS

Testele de legare GTPγS monitorizează activarea proteinelor G asociate receptorilor şi, cu toate că testul este specific pentru receptorii cuplați cu Gi şi Go, s-a demonstrat că el este, de asemenea, aplicabil pentru proteinele Gq (proteine G) cuplate cu GPCRs ce urmează după procedura de imunoprecipitare [Carrillo JJ. şi

colab., 2002]. Prin substituția GTP pentru GTPγS[S35], activarea proteinelor Gα au ca rezultat încorporarea GTPγS nonhidrolizabil şi marcat radioactiv [S35], permițând cuantificarea proteinelor Gα activate.

Deşi există exemple de oGPCRs care au fost deorfanizați folosind acest test, inclusiv identificarea eicosanoizilor ce prezintă activități agoniste împotriva oGPCR TG1019 [Hosoi şi colab., 2002], testul este foarte rar utilizat în calitate test de screening primar. Cu toate acestea, testul poate fi utilizat pentru confirmarea cuplării şi stimulării proteinelor Gi de oGPCR activat odată ce potențialii liganzi au fost identificați.

Tabelul 4.2. Receptorii deorfanizați şi liganzii identificați (după Dingermann şi colab. 2004)

Ligand	**Receptor**	**Testul utilizat**	**Anul identificării**
5-HT	5-HT1A	Legare a radioligandului	1988
Adenozina	A2A	AMPc	1990
Adenozina	A1	AMPc	1991
5-HT	5-HT1D	AMPc	1991
Peptide înrudite cu bombesina	bombesina	Ovocite	1993
Nociceptina/orfanina FQ	ORL-1	AMPc	1995
Neuropeptidul Y	Y2	Legare a radioligandului	1995
AZ3B	C3a	$[Ca^{2+}]i$, ovocite	1996
Factorul 1 derivat din celule stromale	CXCR4 (LESTR, fusin)	$[Ca^{2+}]i$	1996
CIRL	α laurotoxina	Legare a radioligandului	1997
Peptidul legat de gena pentru calcitonină	Receptorul CGRP; CRLR	AMPc	1996, 1998
Grelina	GHS-R	$[Ca^{2+}]i$	1996, 1999
Leukotriena B4	BLTR	Legare a radioligandului	1997
Hipocretina/orexina	Orexina A şi B	$[Ca^{2+}]i$	1998
Hormonul de eliberare al tirotropinei	THR2	Legare a radioligandului	1998
Peptidul de eliberare al prolactinei	GPR10 (hGR3)	Acid arahidonic	1998
Apelin	APJ	Ext.pH (citosenzor)	1998
CRLR	CGRP	ovocite	1998
Chemoatractantul pentru limfocite B	BLR1	Activitate chemotactică	1998
1 fosfat sfingozina	EDG 1, 3, 5, 6 şi 8	$[Ca^{2+}]i$, AMPc, ovocite	1998-2000

Acidul lizofosfatic	EDG 2, 4 şi 7	$[Ca^{2+}]i$, AMPc, drojdia de bere	1998-2000
CIRL-2	α-laurotoxina	Legare a radioligandului	1999
Histamina	H3 (GPCR97)	AMPc, legare a radioligandului	1999
Hormonul de concentrare al melaninei	SLC-1 (MCH1, GPR24)	$[Ca^{2+}]i$	1999
Urotensina II	UII (GPR14, SENR)	$[Ca^{2+}]i$,	1999
Motilina	Motilina GPR38)	$[Ca^{2+}]i$, aequorina	1999
Leukotriena D4	Cys-LT1R (HG55, HMTMF81)	$[Ca^{2+}]i$	1999
Leukotriena B4	BLT2 (GPR16)	AMPc, legare a radioligandului	2000
Neuromedin U	NMU1R (FM-3, GPR66)	$[Ca^{2+}]i$	2000
Neuromedin U	NMU2R (FM-4, TGR-1)	$[Ca^{2+}]i$	2000
Prostaglandina D2	PGD2 (CRTH2)	$[Ca^{2+}]i$	2000
Neuropeptidul FF şi AF	NPFF2 (HLWAR77)	$[Ca^{2+}]i$	2000
Neuropeptidul FF	NPFF1 (OT7T022), NPFF2	Ovocite	2000
Sfingozilfosforilcolina	SPC (OGR-1)	$[Ca^{2+}]i$	2000
Histamina	H4 (AXOR35)	AMPc, legare a radioligandului	2000
UDP-glucoza	P2Y14 (KIAA0001, GPR105)	Drojdia de bere	2000
Leukotriena C4 şi D4	Cys-LT2R (PSECO146, AXOR54)	$[Ca^{2+}]i$, ovocite	2000
Eskina	CCR10 (GPR2)	$[Ca^{2+}]i$	2000
CXCL16	BONZO, STRL33, TYMSTR (CXCR6)	Analiză prin flowcitometrie$[Ca^{2+}]i$	2000
β-PEA şi triptamina	TA_1, TA_2	Ovocite, AMPc, legare a radioligandului	2001
Hormonul de con-centrare al melaninei	MCH2 (AXOR21)	$[Ca^{2+}]i$	2001
ADP	P2Y12 (SP1999)	Ovocite	2001
Amine biogene, trace amine	TA_1, TA_2	Ovocite	2001
Psicozin	TDAG-8	AMPc	2001

Lizofosfatidil colina	G2A	$[Ca^{2+}]i$	2001
KISS-1	metastatin (GPR54, hOT7T175, AXOR12)	$[Ca^{2+}]i$	2001
Sfingozilfosforilcolina şi lizofosfatidilcolina	GPR4	Legarea radioligandului, Teste de gene reporter	2001
NPAF	mrgA4	$[Ca^{2+}]i$	2001
NPFF	mrgA1	$[Ca^{2+}]i$	2001
Relaxina	LGR7	AMPc	2001
Relaxina	LGR8	AMPc	2001
Anioni de acid carboxilic cu lanț scurt	GPR41, GPR43	Drojdie de bere	2002
Fragmente complement	C5L2	Legarea radioligandului	2002
Neuropeptidul W	GPR7 şi GPR8	GTPγS	2002
Acizi biliari	M-bar (BG37)	AMPc	2002
5,8,11 Acid eicosatrinoic	GPR40	$[Ca^{2+}]I$, Teste de gene reporter	2002
Adenina	Receptor pentru adenină la şobolan	$[Ca^{2+}]i$	2002
Produsul genei proencefalina A	GPCRs (SNSRs) specifici neuronilor senzoriali	$[Ca^{2+}]i$	2002
Acid nicotinic	HM74 (GPR109)	$[Ca^{2+}]i$, aequorina, AMPc, GTPγS	2003
Acid nicotinic	HM74A	GTPγS	2003
Sfingozilfosforilcolina	GPR12	$[Ca^{2+}]i$, aequorina	2003

4.4.2. Evaluările AMPc

AMPc este unul dintre cele mai importanți mesageri secunzi pentru controlul diferitelor căi metabolice. De-a lungul anilor au fost dezvoltate o serie de teste pentru a măsura formarea de AMPc din AMP prin adenilil ciclază (AC) după stimularea receptorilor. Enzima efectoare AC este activată de către proteinele Gs şi inhibată de proteinele Gi, şi, prin urmare, aceste teste pot fi folosite pentru a monitoriza activarea unei game variate de GPCRs.

Dezvoltarea de radioimumoteste, tehnici sensibile şi reproductibile şi imunoteste bazate pe fluorescenţă au înlocuit tehnicile vechi care se bazau pe ATP marcat, urmate de extracţia şi de determinarea cantităţii de AMPc marcat, nou format sau pe dispariţia precursorilor.

Testele pentru evaluarea AMPc au fost utilizate pe scară largă pentru a ajuta deorfanizarea oGPCRs (tabelul 4.2), incluzând, de exemplu, receptorii pentru relaxină şi histamina H3.

4.4.3. Evaluările Ca^{2+}

Diverşi GPCRs cresc Ca^{2+} intracelular prin stimularea eliberării Ca^{2+} din depozitele intracelulare şi a influxului extracelular de Ca^{2+}. Un răspuns tipic de Ca^{2+} mediat de GPCR se caracterizează printr-o creştere rapidă tranzitorie a concentraţiei intracelulare de Ca^{2+}, care este urmată de o creştere susţinută a concentraţiei de Ca^{2+}. Este acceptat pe scară largă faptul că activarea mobilizării Ca^{2+}, prin GPCRs este asociată cu fosfolipaza C (PLC) – ce catalizează hidroliza inozitol fosfolipidelor membranare. Receptori cuplaţi cu Gq pot activa proteine G care aparţin familiei de proteine Gq, pentru a activa hidroliza mediată de PLC a fosfatidil-4 ,5-bifosfatului [PI (4,5) P2] ce conduce la formarea de inozitol-1 ,4,5-trisfosfat [Ins (1,4,5) P3] şi 1,2-diacilglicerol (DAG). Receptorii Ins (1,4,5) P3 din reticulul endoplasmic (ER) mediază ulterior eliberarea de Ca^{2+} din ER şi, prin urmare, creşte[Ca^{2+}]i, întrucât eliberarea DAG poate activa alţi efectori cum ar fi izoformele proteinazei C (PKC) şi protein kinazei D (PKD) şi afectează influxul de [Ca^{2+}]i prin activarea tranzitorie a canalelor receptorilor cu potenţial de canal (TRPC)[Hofmann şi colab., 1999].

Prin monitorizarea modificărilor nivelurilor intracelulare de Ca^{2+} în celule, s-au identificat orexinele, o familie de neuropeptide hipotalamice care au fost izolate din extracte tisulare, ca liganzi naturali pentru receptorii orfani anteriori, care sunt acum cunoscuţi ca receptori pentru orexină [Sakurai şi colab., 1998]. Autorii au folosit Fura-2, unul dintre fluoroforii comercial disponibili care îşi schimbă fluorescenţă caracteristică la legarea de Ca^{2+}. În ultimii ani au devenit disponibile numeroase modele care pot fi utilizate pentru măsurarea modificărilor [Ca^{2+}]i [Zacharias şi colab.,

2000]. Unul dintre cei mai cunoscuți cititori de plăci pentru măsurarea [Ca^{2+}]i este cititorul de plăci cu imagine fluorometrică (FLIPRTM), care a fost, de asemenea, utilizat pe scară largă pentru deorfanizarea oGPCRs. Sistemul FLIPR monitorizează răspunsul populațiilor celulare în plăci (godeuri) la medicamente potențial candidate. Unul dintre ultimii oGPCRs care au fost deorfanizați folosind FLIPR este GPR40, un GPCR pentru lanțul lung al acizilor grași, cum ar fi acidul eicosatrinoic [Briscoe şi colab., 2002]. Un alt test de sistem de monitorizare a [Ca^{2+}]i se bazează pe fotoproteina aequorina prezentă la peştele *Aequorea Victoria*. Legarea Ca^{2} la aequorină determină oxidarea substratului coelenterazina pentru producerea de fotoni, care pot fi detectați cu luminometru (fig. 4.4).

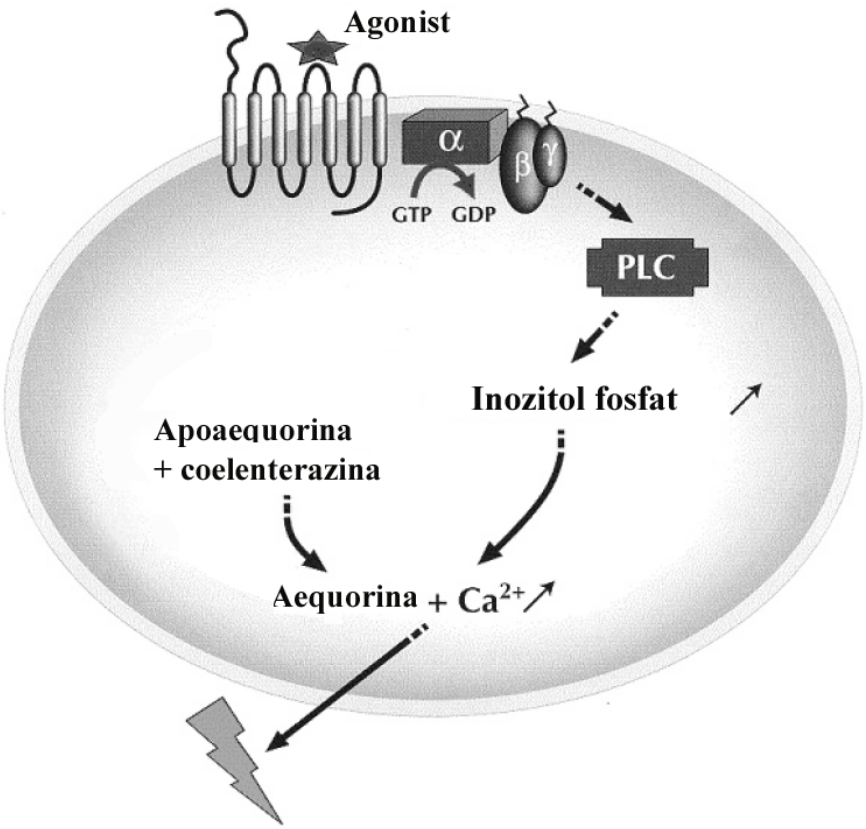


Fig. 4.4 Evaluarea modificărilor Ca^{2+} mediate de receptor pe calea sistemului de aequorine. Activarea mediată prin stimularea receptorilor a PLC fie prin intermediul $G_{\alpha q/11}$, sau, de exemplu, prin $G_{\alpha q5i}$ himerice au ca rezultat formarea inozitolfosfatului şi ulterior creşterea intracelulară a Ca^{2+} (a se vedea secțiunile 4.4.3 şi 4.4.6). Interacțiunea Ca^{2+} cu aequorina, o fotoproteină care este coexprimată împreună cu receptorul de interes, duce la oxidarea coelenterazinei, cu care celulele sunt încărcate înainte de stimularea receptorilor pentru a produce fotoni, care pot fi detectați printr-un luminometru (după Dingermann şi colab., 2004).

4.4.4. Microfiziometru citosenzor

În contrast cu evaluarea schimbărilor de Ca^{2+} sau AMPc intracelular, mai multe teste generice pot fi de asemenea folosite pentru măsurarea activării receptorilor. „Citosensorul“ este un microfiziometru care utilizează modificările pH-ului extracelular care sunt însoțite de schimbări ale activități celulare (de exemplu, activarea GPCR), şi a fost utilizat cu succes pentru a identifica liganzii pentru receptorii CCR5 şi pentru caracterizarea farmacologică a numeroşi GPCRs [Wu şi colab., 1997]. Testul are o specificitate mai degrabă scăzută, motiv pentru care multe alte teste au câştigat popularitate față de acest sistem de testare. Cu toate acestea, testul poate fi util pentru deorfanizarea GPCRs acolo unde nu este nevoie de cunoştințe anterioare despre căile de transducție a semnalelor care pot fi activate de aceşti oGPCRs.

4.4.5. Teste bazate pe gene reporter

De asemenea modificările nivelurilor intracelulare de mesageri secunzi pot determina modificarea expresiei diferitelor gene, ca urmare a modulării activității factorilor de transcripție. Aceşti factori de transcriere se pot lega la factori de transcripție specifici prezenți în regiunile promotor ale genelor pentru a intensifica sau reprima expresia genelor. Testele bazate pe gene reporter vor monitoriza activarea diferiților factori de transcripție cum ar fi CRE, TRE, SRE, NF-kB şi AP-1, transcripție mediată, de exemplu, de luciferaza şi β-galactozidaza, pentru care activitatea enzimatică poate fi analizată în lizatul celular, şi cu proteina fluorescentă verde (GFP). Tehnologia bazată pe gene reporter este acum utilizată pe scară largă pentru monitorizarea evenimentelor celulare asociate cu transducția semnalului şi expresia genelor. Principalul avantaj al acestor teste îl constituie sensibilitatea mare, fiabilitatea, convenabilitatea şi adaptabilitate la scară largă a măsurătorilor [Hill şi colab., 1999].

Testele bazate pe gene reporter au fost utilizate pentru a ajuta deorfanizarea diferiților oGPCRs, incluzând, de exemplu, receptorul pentru sfingozilfosforilcolina

care induce transcripția genei mediată de SRE [Zhu şi colab., 2001] şi receptorul H4 pentru histamină.

În plus, genele reporter pot fi utilizate ca gene marker pentru a cuantifica răspunsurile proliferative celulare sau formarea AMPc. În aceste cazuri, genele reporter nu se află sub control transcripțional direct ca în cazul testelor bazate pe gene reporter. O platformă de tehnologie bazată pe celule pentru evaluarea funcțională a familiilor genelor pentru medicamente, inclusiv GPCRs, se numeşte Tehnologie de Amplificare şi Selecție de Receptor (R-SAT^{TM}) şi utilizează o astfel de genă marker ca o citire funcțională [Croston şi colab., 2002]. Acest test a fost recent utilizat pentru dezvoltarea de liganzi nonpeptidergici pentru receptorul pentru urotensină II şi a arătat că aplicarea de teste pe bază de celule poate produce liganzi cu situsuri de legare pentru receptori care sunt diferite de situsurile de legare care sunt utilizate de liganzi receptorilor nativi [Spalding şi colab., 2002].

4.4.6. Cuplarea proteinelor G cu GPCR

Pentru a creşte probabilitatea de a identifica un ligand nativ pentru un receptor orfan, screeningul funcțional care este utilizat trebuie să fie adaptat pentru o gamă largă de GPCRs. Astfel, activarea GPCRs care se cuplează cu membrii din familii distincte de proteine G heterotrimerice necesită un răspuns uniform.

Receptorii au o eterogenitate în specificitatea cuplării față de legarea lor şi de activarea proteinelor G, şi, ca rezultat un receptor poate activa proteine G care aparțin de diverse familii de proteine. Deşi unii GPCRs se cuplează cu membrii de la toate familiile de proteine G heterotrimerice, cei mai mulți GPCRs se cuplează cu o anumită specificitate la diferite proteine G. Cu toate acestea, contextul celular, va determina, de asemenea, care proteine G sunt activate în cele din urmă odată cu activarea anumitor GPCR. Astfel în afară de afinitatea anumitor GPCRs pentru diferite proteine G, cantitățile specifice de proteine G exprimate au un rol important. Pe baza acestui principiu, proteinele G specifice pot fi coexprimate împreună cu GPCRs pentru a promova activarea acestor proteine G ca să fie direcționate pentru transducția semnalului prin căi comune. Aceasta tehnică s-a dovedit funcțională în

special pentru Gα16 şi omologul său murin Gα15, proteine G care afişează un model de expresie foarte restrâns al exprimării endogene. Aceste proteine G eterogene aparţin familiei Gq de proteine G, a căror activare are ca rezultat activarea PLC, care duce la producerea de diacilglicerol şi inositolfosfat, şi creşte concomitent nivelul intracelular de Ca^{2+} şi al efectoriilor lor din aval, şi prin urmare, este ideal pentru diferite screeninguri (a se vedea secţiunea 4.4.3) [Offermanns şi colab., 1995].

Având în vedere faptul că expresia atât a receptorilor cît şi a proteinelor G este adecvată, variabilitatea receptorilor, în principiu, ar trebui virtual să permită oricărui receptor să semnalizeze prin proteine G specifice pentru a activa o anumită cascadă de transducţie a semnalului. Cu toate acestea, nu toţi receptorii par a interacţiona cu proteinele G cu aceeaşi afinitate şi pentru unii receptori nu este foarte evident că sunt pregătiţi pentru teste de screning funcţional.

Domeniul C-terminal al proteinei Gα este un domeniu cheie în interacţiunea GPCR- proteină G [Hamm şi colab., 2001]. Proteine G himerice, în care ultimii dintre aminoacizi au fost înlocuiţi cu aminoacizi corespunzători care sunt prezenţi în alte familii de proteine G, au fost utilizate pe scară largă în teste de screening pentru a facilita o cuplare funcţională a receptorilor, care să permită un screening funcţional pentru liganzii care modifică activitatea receptorilor. Probabil, cele mai frecvent utilizate proteine G himerice sunt cele în care în ultimii cinci aminoacizi ai Gαq au fost înlocuiţi de către cei ai Gαi, Gαo sau Gαz, şi sunt în mod obişnuit numiţi Gαqi5, Gαqo5 şi Gαqz5. Aceste proteine himerice Gαq au o eterogenitate crescută în legătură cu receptorii cuplaţi cu Gαi/o, permiţând receptorilor cuplaţi cu Gαi/o să se cupleze cu creşterea nivelului de intracelular Ca^{2+}; ele sunt de obicei utilizate în teste de screening, folosind FLIPR (a se vedea secţiunea 4.4.3) [Coward şi colab., 2000].

Alternativ, un amestec de proteine G, inclusiv proteine G himerice, pot fi coexprimate împreună cu oGPCR de interes pentru a creşte probabilitatea oGPCR cuplaţi cu proteine G adecvate să producă un răspuns biologic şi astfel, să crească probabilitatea de a identifica un ligand nativ pentru oGPCR.

Eterogenitatea receptorilor poate fi prelungită prin forţarea receptorilor de a se cupla cu o proteină G proiectată care se leagă fizic de proteine GPCR, cu sensul de

proteine de fuziune. Astfel de receptori ai proteinelor de fuziune şi proteinelor G pot fi folosiți ca un instrument pentru screeningul liganzilor şi în prezent au fost descrise pentru receptorii fuzionați fie cu G_s, G_i sau G_q [Milligan şi colab., 2000]. Receptori legați la agonişti pot interacționa cu proteinele G şi activează proteinele G asociate din aceste proteine de fuziune. Astfel de fuziuni GPCR-proteine G sunt folosite în scop de screening, aşa cum a fost exemplificat de oGPCR TG1019, care a fost fuzionat cu proteine $G_{\alpha i1}$ şi a fost exprimat în celulele de insecte pentru evaluarea funcțională a TG10119 folosind teste de legare GTPγS, care au condus la identificarea mai multor eicosanoizi ce manifestă activități agoniste împotriva TG1019.

4.4.7. Activitatea GPCR independentă de ligand

Expresia eteroloagă a GPCRs poate determina niveluri de expresie relativ ridicate şi, permite adesea detectarea "activității receptorilor constitutivi" indepenentă de agonist. Această proprietate a GPCRs a fost constatată, de asemenea, pentru mai mulți oGPCRs, incluzând diverşi GPCRs virali [Murphy şi colab., 2001].

Studii recente au demonstrat că mulți antagonişti, pentru o mare varietate de tipuri de receptori au capacitatea intrinsecă de a scădea activitatea receptorilor constitutivi (Dingermann şi colab.,2004). De aceea mulți antagonişti au fost reclasificați ca agonişti inverşi pe baza mai multor teste funcționale diferite, care spre deosebire de tehnicile de legare a radioligandului pot diferenția antagoniştii competitivi de agoniştii inverşi. Au fost utilizate cu succes teste funcționale pentru identificarea medicamentelor candidate, care reduc răspunsul celular rezultat din activitatea receptorilor constitutivi, cum ar fi agoniştii inverşi, şi medicamentele implicate în tratarea bolilor în care activitatea receptorilor independentă de ligand poate fi importantă.

Totuşi ar trebui să se aibă în vedere, că răpunsul biologic agonist independent, observat aparent poate fi consecința unei permanente stimulări prin liganzi ubiquitari, care sunt produşi de linia de celule utilizată pentru exprimarea receptorilor.

Activitatea receptorilor constitutivi este folosită ca o metodă pentru identificarea liganzilor pentru receptori. Chiar dacă nu toți GPCRs de tip sălbatic prezintă un înalt grad de activitate constitutivă, coexprimarea acestor receptori cu proteine G adecvate poate creşte proprietățile de semnalizare bazală, ca să permită oportunități mai bune pentru identificarea de compuşi, care reduc activitatea intrinsecă a unor astfel de receptori [Burstein şi colab., 1997]. Alternativ, aceştia pot fi proiectați ca receptori "mutanți activi constitutiv" (CAM) ce sunt creați prin modificări induse de substituția unor aminoacizi în conformația receptorilor.

Receptorii CAM sunt, de obicei, creați pe baza unei analogii cu efectele activității receptorilor care apar odată cu mutația resturilor specifice în alți GPCR. O secvență care este adesea analizată când un receptor CAM este dorit, este secvența DRY de aminoacizi tipică GPCR care se găseşte în aval de al treilea domeniu transmembranar (TM3) al celor mai mulți GPCRs şi este implicată în interacțiunea receptor-proteină G.

Un alt domeniu care poate fi luat în considerare pentru a genera CAM este TM6. Orientarea relativă TM3 şi TM6 este considerată a fi importantă pentru activitatea receptorilor în trecerea de la forma inactivă la forma activă a GPCR şi este însoțită de o schimbare în orientarea relativă a acestor două domenii TM concomitent cu rotația TM6.

Crearea unui receptor CAM face ligandul agonist (natural) incapabil să inducă un răspuns funcțional al receptorilor într-un test celular, aceasta constituind baza tehnologiei de activare a receptorilor constitutivi (CART) [Chalmers şi colab., 2002]. Când astfel de receptori CAM sunt creați şi folosiți în screeningul funcțional, cea mai importantă este identificarea liganzilor prin capacitatea lor de a reduce activitatea intrinsecă a receptorilor; cu alte cuvinte, pentru a identifica agoniştii inverşi pentru receptorul mutant.

Ligandul identificat şi /sau analogii apropiați de acesta pot fi apoi utilizați pentru studiul interacțiuni lor potențiale cu receptorul de tip sălbatic.

4.4.8. Strategii noi de screening

Pe lângă metodele de screening descrise de mai sus, mai multe tehnologii noi devin disponibile pentru caracterizarea GPCR şi, deci, pentru screening-ul oGPCR.

GPCRs transduc cea mai mare parte a semnalelor la proteine G heterotrimerice. După schimbarea GDP legat de subunitatea Gα în GTP, proteinele G heterotrimerice activate se disociază de receptor într-o subunitate Gα legată la GTP şi un heterotrimer Gβγ. Testele bazate pe fluorescenţă cu transfer de energie prin rezonanţă (FRET) – utilizează mecanismul de transfer al energiei de la o componentă donor la o componentă acceptor, care este în funcţie de distanţa dintre aceste două componente. Prin urmare, testele bazate pe FRET pot fi folosite pentru a monitoriza distanţa între fluorofori. Recent, un astfel de test bazat pe FRET a fost adaptat pentru disocierea proteinelor G heterotrimerice odată cu activarea receptorilor [Janetopoulos şi colab., 2001], rezultând un test funcţional care, în principiu, ar putea fi folosit pentru orice GPCR, cu condiţia ca proteinele G fluorescente să interacţioneze cu GPCRs în acelaşi mod ca şi cu proteinele G de tip sălbatic.

Una din cele mai recente tehnologii implicate în domeniul de evaluare a activităţilor biologice la nivel celular este componenta mare de screening. Principiul pentru această tehnică de screening se bazează pe reamenajarea spaţială a proteinelor care „apar” în timpul iniţierii proceselor de transducţie a semnalului şi, de aceea, aceste tipuri de teste sunt cunoscute sub numele de teste de translocare a proteinelor. Proteinele translocate pot fi monitorizate în timp, de exemplu, stimularea receptorilor pe baza proteinelor de fuziune fluorescente, cum ar fi, GFP din peştele *A.Victoria* [Ghosh RN. şi colab., 2000]. Valoarea testului o constituie recunoaşterea spaţială automată şi cuantificarea fluoroforilor în celule prin algoritmii proiectaţi special, care teoretic poate fi realizată pentru mai mulţi fluorofori simultan, permiţând astfel monitorizarea automată a activării cascadelor de transducţie a diferitelor semnale în aceeaşi celulă în acelaşi timp. La fel ca multe proteine care participă în cascadele de transducţie a semnalului activate de GPCR, o întreagă gamă de proteine poate fi luată în considerare prin marcare fluorescentă în scopuri de screening cu conţinut înalt, incluzând GPCRs, proteine G , arestine şi de factori de transcripţie, cum ar fi NF-kB

[Dingermann şi colab., 2004]. GPCRs sunt translocaţi în mod normal de la suprafaţa celulară în endozomii acizi intracelulari, odată cu stimularea prelungită de către agonişti. Prin urmare, marcarea fluorescentă a GPCRs, utilizând, de exemplu GFP este utilizată adesea pentru a confirma ţintirea corectă a GPCR exprimaţi de membrana plasmatică permiţând detecţia noninvazivă a receptorului marcat odată cu stimularea receptorilor (fig. 4.5). Cu toate acestea, marcarea receptorului, poate modifica proprietăţile farmacologice ale receptorului. Alternativ, proteinele marcate fluorescent care joacă un rol în desensibilizarea receptorilor pot fi de asemenea utilizate. Membrii familiei arestinelor sunt cel mai frecvent utilizate [Groarke şi colab., 1999]. O nouă metodă pentru a determina specificitatea ligandului pentru GPCRs este imobilizarea funcţională a GPCRs pe suprafaţă de sticlă [Fang, 2002]. În acest mod, mai mulţi GPCRs pot fi evaluaţi simultan pentru ligandul lor sau pentru potenţialul de legare al proteinei G, folosind liganzi marcaţi fie radioactiv sau fluorescent, fie prin folosirea rezonanţei plasmatice de suprafaţă [Cooper şi colab., 2002]. Cu toate că aceste tehnici trebuie să fie încă puse la punct, generarea de GPCRs funcţionali pentru strategii noi HTS va oferi potenţialul pentru deorfanizarea GPCRs prin screening-ul lor împotriva liganzilor cunoscuţi .

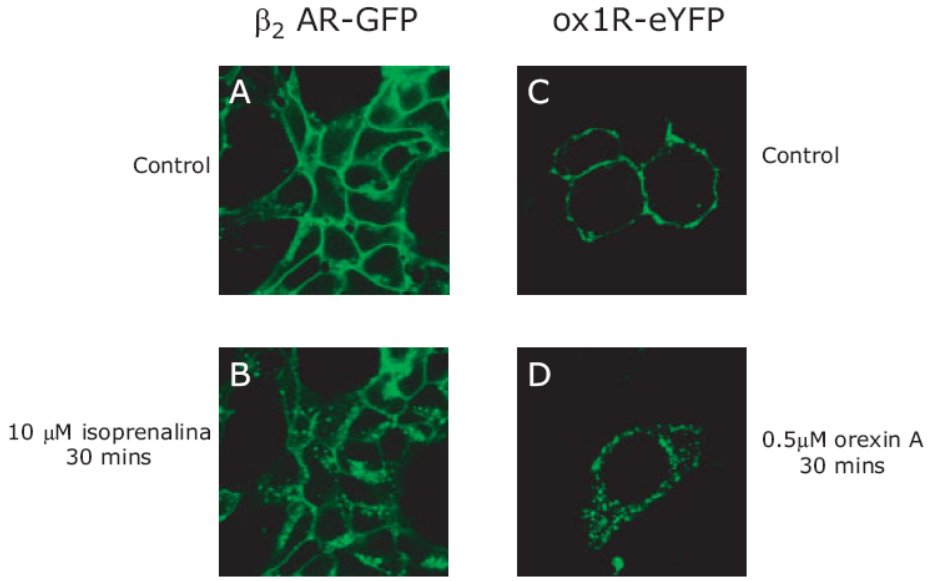


Fig. 4.5. Marcarea GPCRs la nivelul capătului C-terminal cu o proteină fluorescentă permite urmărirea proteinelor receptor în timp odată cu stimularea. Proteinele de fuziune GFP ale receptorului β2-adrenergic (A) sau pentru orexina 1 (C) determină o localizare asociată la membrană a receptorilor. Stimularea receptorului β2-adrenergic cu receptorul β2 izoprenalin agonist (B) sau a receptorului orexinei 1 agonist(D), au ca rezult translocarea receptorilor marcaţi fluorecent din membrana plasmatică în vezicule localizate intracelular.

4.5. Perspective

Completarea secvențializării genomului uman va permite dezvoltarea de potențiale molecule terapeutice candidate îndreptate împotriva țintelor noi, derivate din utilizarea datelor despre genom. Speranțele genomice sunt legate de identificarea de noi medicamente țintă incluzând GPCRs [Venter şi colab., 2001]; cu toate acestea, genomica este insuficientă pentru a stabili dacă o genă anume corespunde la un medicament țintă optim. Revoluția genomicii a propulsat progresul tehnologic, care promite să aibă ca rezultat un proces rapid de validare a țintei pentru etiologia bolii. În absența unor medicamente țintă viabile, identificarea țintelor tradiționale a fost eludată prin căutarea inițială de molecule eficace în sistemele model pentru boală. În acest sens, deşi acidul nicotinic a fost folosit zeci de ani pentru tratamentul dislipidemiei producând o normalizare dorită a factorilor de risc cardiovascular, mecanismul de acțiune a rămas necunoscut. Tunaru şi colab. (2003) şi Wise şi colab., (2003) au identificat doi oGPCRs ca GPCRs cu afinitate mare şi mică pentru acidul nicotinic, oferind posibilitatea de a dezvolta noi terapii. În mod similar au fost identificați LGR7 şi LGR8 [Hsu şi colab., 2001], receptori pentru hormonul relaxina, unul dintre primii hormoni de reproducere identificați [Civelli şi colab., 1999]. Aceştia sunt GPCR care aparțin la o familie bogată în domenii de leucină care se repetă. În ceea ce priveşte oportunitățile pentru descoperirea medicamentelor, receptorii orfani arată un incredibil potențial ca ținte în descoperirea medicamentelor. Multe proiecte care au ca scop descoperirea medicamentelor țintă utilizează genomul GPCR uman pentru abordarea genomică funcțională cu scopul de a descoperi noi medicamente țintă. Legăturile anticipate între validarea țintelor bazate pe genomică şi procesele de identificare de mare capacitate a liganzilor vor defini căile de exploatare farmacologică a datelor genomului.

Căutarea de liganzi nativi pentru receptori orfani a fost inițiată pentru a permite descoperirea de numeroase neuropeptide noi care sunt propuse pentru a deveni punctul central al programelor implicate în descoperirea de noi medicamente.

Într-adevăr, numeroase programe pentru deorfanizarea receptorilor au identificat de exemplu orfanina FQ/nociceptina [Meunier şi colab., 1995],

orexinele/hypocretinele [Sakurai şi colab., 1998], peptidul de eliberarea de prolactină [Hinuma şi colab., 1998], peptidul ciclic urotensina II [Ames şi colab., 1999], grelina [Kojima şi colab., 1999] şi apelina [Tatemoto şi colab., 1998], ca liganzi neuropeptidici pentru receptori orfani. Identificarea liganzilor pentru aceşti receptori a amplificat cercetarea neuropeptidelor, şi aceşti receptori sunt acum implicați într-o mare varietate de situații fiziologice şi patofiziologice, incluzând reglarea apetitului, aterosclerozei şi transmiterea durerii.

Pe baza omologiei secvenței oGPCR a fost identificată o întreagă familie de gene *mas* legate ce codifică oGPCRs. Aceste gene sunt exprimate doar în anumite subtipuri de neuroni senzoriali care sunt cunoscuți ca detectori de stimuli dureroşi [Dong şi colab., 2001]. MrgA1 şi mrgA4, au fost ulterior identificați ca potențiali NPFF şi respectiv NPAF GPCRs. MrgA1 şi MrgC11 s-au dovedit de asemenea, a fi activați specific de agonişti surogat, sugerând că liganzii endogeni ai receptorilor Mrg sunt susceptibili de a fi peptide înrudite cu amidele RF (Y) G şi / sau RF (Y) [Dong şi colab., 2001]. Interesant este că un oGPCR legat de MrgA1 a fost identificat ca receptor pentru adenină [Bender şi colab., 2002]. Mai mult decât atât, SNSR1, un receptor care aparține la familia de GPCRs neuro-senzoriali specifici, este strâns legat de MrgC11 şi s-a dovedit că este activat de produşii genei proencefalina A [Lembo şi colab., 2002].

În final, odată cu activarea ligandului s-a descris cea mai mare şi mai provocatoare etapă ce implică utilizarea ligandului identificat pentru a evalua rolul fiziologic al receptorului şi potențialul acestuia ca o țintă terapeutică pentru descoperirea de medicamente. Prin urmare, rămâne încă provocarea pentru stabilirea de sisteme fiziologice şi de biologie celulară relevante, în care să se testeze eficacitatea acestor molecule.

Este important ca în această etapă să avem informații complete şi detaliate despre profilurile expresiei receptorilor şi liganzilor atât în țesuturi normale, cât şi patologice, cu scopul de a direcționa aceste studii în modul cel mai eficient. În plus, disponibilitatea animalelor transgenice sau cu gene knockout poate fi de asemenea utilă în evaluarea funcției receptorului. Interesant, GPR8, identificat ca un receptor

pentru neuropeptidul W [Shimomura şi colab., 2002], este absent, la rozătoare, făcând validarea ţintei pentru un astfel de receptor mai dificilă.

În cele din urmă, cei mai mulţi, dacă nu toţi, receptorii orfani vor fi deorfanizaţi. Liganzii nativi nu au fost identificaţi încă pentru toţi oGPCRs. Deşi dezorfanizarea oGPCRs poate părea destul de simplă, de multe ori nu este aşa de simplu. Există, de exemplu, oGPCRs pentru care se cunosc liganzi sintetici care se pot lega şi chiar activa proteinele G, cu toate că liganzii naturali pentru aceşti receptori rămân necunoscuţi. Un exemplu de un asemenea receptor pentru care ligandul agonist sintetic a fost identificat este receptorul pentru bombesina 3 [Weber şi colab., 2002]. Cu toate că disponibilitatea acestor agonişti a permis studii de farmacologie a receptorilor, inclusiv evaluarea căiilor de semnalizare care sunt activate de acest receptor, liganzii naturali pentru aceşti GPCRs rămân necunoscuţi.

Unora dintre oGPCRs li s-a atribuit importante roluri fiziologice. Pentru unii dintre oGPCRs exprimarea este indusă de stimuli speciali care furnizează indicii potenţiale pentru funcţia receptorilor. Un exemplu de oGPCR cu un important rol fiziologic potenţial este GPR30 [Carmeci şi colab., 1997], un GPCR care este asociat cu exprimarea receptorului pentru estrogen în cancerul de sân şi care pare a inhiba creşterea celulelor [Ahola şi colab., 2002].

Aceşti oGPCRs oferă un incredibil potenţial de ţinte medicamentoase pentru dezvoltarea de terapii valoroase. Este puţin probabil ca actualul interes pentru GPCRs ca ţinte pentru medicamente se va diminua, după ce mai mulţi oGPCRs se vor asocia cu ligandul lor natural. Implicarea acestora într-o multitudine procese fiziologice conservă interesul pentru oGPCRs. Progresele tehnologice viitoare vor accelera ritmul de descoperire a medicamentelor, şi timpul va decide dacă GPCRs deorfanizaţi vor oferi medicamentele ţintă anticipate în viitor.

PARTEA A II-A: SINTEZA MEDICAMENTELOR PE BAZA ENZIMELOR ŞI ACIZILOR NUCLEICI

CAPITOLUL 5

SINTEZA STEREOSELECTIVĂ A MEDICAMENTELOR CU AJUTORUL ENZIMELOR RECOMBINANTE

5.1. Sinteza stereoselectivă înainte de apariția ingineriei genetice

Obținerea prin fermentație (în 1880) a acidului lactic **1** optic activ a fost unul dintre primele procese de sinteză stereoselectivă evidențiate care a utilizat microorganisme naturale (fig. 5.1).

În 1858, Pasteur a demonstrat că fermentația sării de amoniu a acidului tartric cu *Penicillium glaucum* a indus formarea acidului tartric (S,S) **2**.

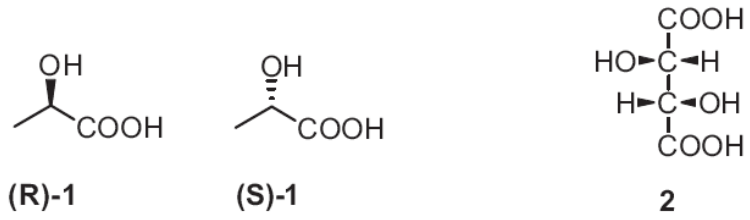
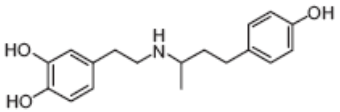
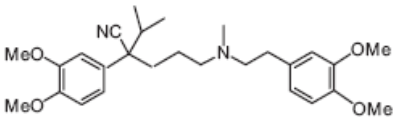
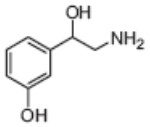
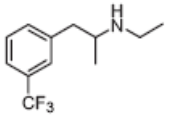
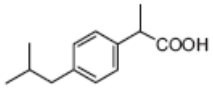
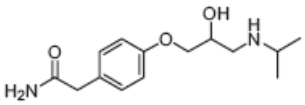
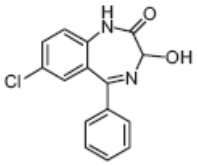


Fig. 5.1 (R)- şi (S)- acid lactic 1; (S,S)-acid tartric (2)

Pe măsură ce descoperirea noilor medicamente, cu origine atât naturală cât şi sintetică a progresat, şi structura medicamentelor a fost elucidată, ele au fost obținute fie prin extracție din sursele naturale, fie prin procedee sintetice clasice. În ultimul caz, aceasta a condus în general la formarea amestecurilor racemice când moleculele au avut centrii optici activi.

Tabelul 5.1 prezintă câteva medicamente care erau disponibile în anii ’80 ca amestecuri racemice.

Tabelul 5.1. Exemple de medicamente disponibile în 1980 ca amestecuri racemice

Nume	Structură chimică	Observații
Dobutamina	 3	cardiotonic
Verapamil	 4	antagonist de calciu dilatator coronarian
Norfenefrina	 5	adrenergic
Fenfluramina	 6	anorexic
Ibuprofen	 7	antiinflamator
Atenolol	 8	blocant beta adrenergic
Oxazepam	 9	sedativ

De curând a fost demonstrat faptul ca enantiomeri diferiți ai aceleiaşi molecule optic active nu îndeplinesc obligatoriu aceleaşi acțiuni farmacologice. Dimpotrivă, în câteva cazuri, enantiomerii (vezi capitolul 7)au manifestat arii total diferite ale activității farmacologice, iar în unele cazuri au fost chiar toxici. Tabelul 5.2 prezintă exemple de medicamente ai căror enantiomeri au activități farmacologice diferite.

Cercetarea legăturilor între structura şi activitatea unei molecule a ajutat la înțelegerea acțiunilor farmacologice ale moleculelor medicamentelor.

Necesitatea cercetării medicamentelor chirale este bazată pe următoarele fapte:

- receptorii de pe suprafața celulară sunt molecule biologice care sunt deseori chirale (vezi capitolul 7) în ele însele;
- moleculele eficiente ale medicamentelor trebuie să fie simetrice cu receptorul;
- complianța cu necesitățile reglatorii. FDA (Food and Drug Administration) recomandă companiilor de cercetare farmaceutică să evalueze strict dacă o moleculă nouă a unui medicament poate sau nu poate să fi produsă sub forma unui singur izomer.

Tabelul 5.2 Influența stereochimiei asupra activității farmacologice a unor medicamente

Nume	**Enantiomer D**	**Enantiomer L**
Metildopa	inactiv	antihipertensiv
Penicilamina	antiartritic	foarte toxic
Propoxifen	analgezic	Antitusiv
Metorfan	antitusiv	analgezic
Izoproterenol	activitate bronhodilatatoare puternică	activitate bronhodilatatoare slabă

Se cunoştea că procesele de fermentație implicau etape stereoselective. De asemenea s-a constatat, în cazul penicilinelor, că enzimele au capacitatea de a cataliza reacții chimice într-o manieră stereoselectivă. Fermentația şi biotransformarea la nivelul celulei cu enzime izolate au constituit bazele sintezei stereoselective. În 1921, Neuberg şi Hirsch au descoperit procesul de condensare a benzaldehidei **10** şi acetaldehidei în prezența drojdiilor care conduce la formarea 1-hidroxi-1-fenil-2-propanonei **12** optic active (fig. 5.2), cu formarea acidului piruvic **11** ca intermediar. Reacția este catalizată de enzima piruvat decarboxilaza. Compania farmaceutică germană Knoll AG a utilizat acest component pentru a sintetiza chimic L-(-)-efedrina **13** printr-o metodă patentată în 1930.

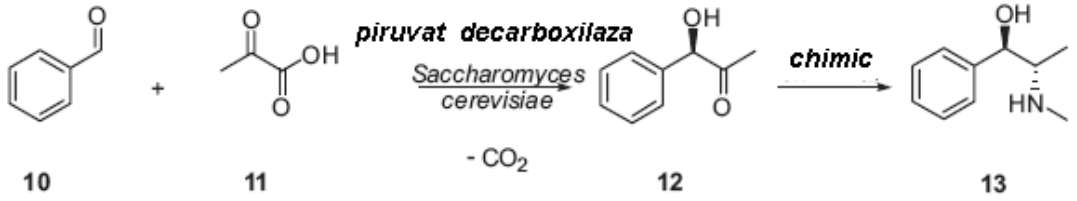


Fig. 5.2 Producția de L-efedrină prin biotransformarea stereoselectivă microbiană

O altă etapă importantă în biotransformarea stereoselectivă înainte de dezvoltarea ingineriei genetice a constituit-o descoperirea hidroxilării stereo- şi regioselective de către *Rhizopus arrhuis* a progesteronului **14** la 11-*α*-progesteron **15**, un intermediar important pentru sinteza cortizonului **16** (fig. 5.3). Sinteza chimică a cortizonului este extrem de dificilă şi neviabilă din punct de vedere economic. Descoperirea căii microbiene pentru hidroxilare a redus prețul cortizonului la 3% din prețul anterior.

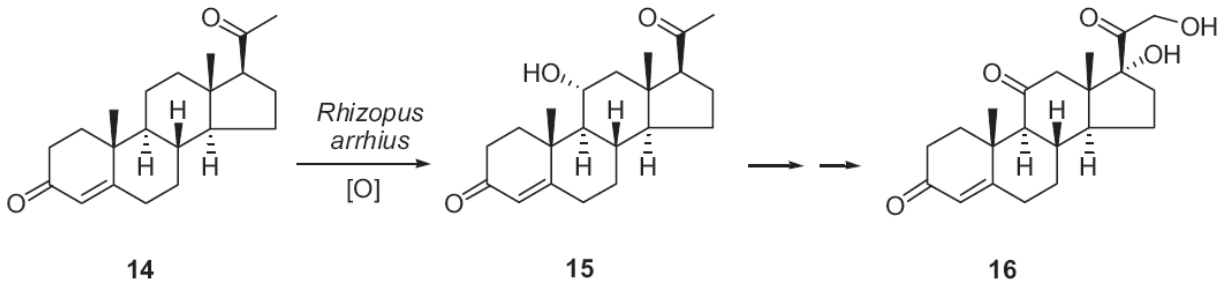


Fig. 5.3 Reducerea microbiană stereo- şi regioselectivă a progesteronului la 11-*α*-hidroxiprogesteron

Varietatea substraturilor şi tipurile reacțiilor catalizate stereoselectiv de către biocatalizatori sunt în continuă creştere. În tabelul 5.3 se prezintă exemple de reacții stereoselective tipice din domeniul chimiei medicale, realizate cu biocatalizatori naturali.

Tabelul 5.3. Reacţii stereoselective tipice realizate cu ajutorul biocatalizatorilor naturali

Tipul reacţiei	Biocatalizatorul	Substratul	Produsul
Oxidare	Oxigenaza	Simvastatina	6-β hidroximetilsimvastatina
Dezaminare oxidativă	D-aminoacid oxidaza	cefalosporina C	α-ceto-adipinil-7-ACA
Hidroxilare	benzoat-dioxigenaza	Benzen	1,2-*cis*-dihidroxicatecol
Reducere	piruvat-decarboxilaza	Benzaldehida	(1*R*)-fenilacetilcarbinol
Aminare reductivă	leucin dehidrogenaza	acid trimetilpiruvic	L-tert-leucina
Esterificare	Lipaza	acid 3-benziltio-2-metil propanoic	catena laterală a zofenopril
Hidroliza	Lipaza	(*S*)-ibuprofen metoxi-etil ester	ibuprofen
Izomerizare	Izomeraza	Glucoza	D-fructoza
Condensarea aldolilor	Aldolaza	*N*-acetilmanozamina	Acid *N*-acetilneruaminic

5.2. Metode clasice de îmbunătăţire a tulpinilor pentru sinteza stereoselectivă

Metodele clasice de identificare a noilor enzime şi microorganisme sunt bazate pe tehnici de screening, de exemplu a probelor de sol, sau colectarea tulpinilor prin îmbogăţirea culturilor.

În general, microorganismele izolate din natură produc enzima dorită la nivele prea mici pentru a realiza un proces de producţie eficient din punct de vedere al costului. De aceea, clonarea şi supraexpresia acestora este foarte benefică pentru dezvoltarea procesului. Nu toate microorganismele pot fi cultivate cu ajutorul tehnologiei comune de fermentaţie.Procentul microorganismelor accesibile din totalitatea celor prezente într-o probă este estimat a fi între 0,001 şi 1%, în funcţie de originea probei. Problema este că numai o mică parte din enzimele prezente în natură sunt potrivite pentru evenimentele sintetice, iar anumite caracteristici precum activitatea, stabilitatea, specificitatea substratului şi enantioselectivitatea pot fi mult sub necesităţi [Bornsheuer, 2001].

Până recent aceste limitări au fost depăşite prin metode precum screening-ul biocatalizatorilor alternativi, modificări ale sistemului de reacţie (de la hidroliză la

esterificare), modificări ale parametrilor reacției, etc. Din acest motiv, modificarea microorganismului este foarte utilă pentru dezvoltarea procesului. Îmbunătățirea tulpinilor prin evoluție directă, ca în cazurile îmbunătățirii prin mutație şi selecție, a fost mulți ani utilizată cu succes în multe aplicații microbiologice industriale. Succesul obținut cu metoda mutațiilor genetice aleatorii şi recombinarea cauzată de evoluția direcționată *in vitro* a fost semnificativ. Screening-ul sau selecția ulterioară pentru proprietățile dorite conduce la identificarea enzimei necesare. Atunci când procesele evolutive sunt realizate în laborator, această aşa-numită microevoluție ce apare în culturile bacteriene crescute în chemostat dă naştere la o specificitate enzimatică alterată. Rata producției enzimelor existente şi exprimarea genelor anterior dormante sunt fenomene tipic afectate de către microevoluție.

Metodele clasice de îmbunătățire a tulpinilor s-au bazat pe utilizarea mutagenilor chimici şi pe tehnici de selecție creative pentru identificarea tulpinilor superioare pentru atingerea unui anumit obiectiv. Aceste metode au fost utilizate cu succes în producția industrială a antibioticelor, vitaminelor şi aminoacizilor. Cu toate acestea, profilurile genetice şi metabolice ale tulpinilor mutante au fost foarte puțin caracterizate, iar mutageneza a rămas un proces aleatoriu [Stephanopoulus şi colab., 1998].

Metodele clasice ale îmbunătățirii tulpinilor pot fi sumarizate după cum urmează:

- tehnici de screening;
- colectarea tulpinilor prin culturi îmbogățite;
- mutații genetice aleatorii;
- evoluția direcționată *in vitro*;
- mutageneza chimică.

Mutageneza tradițională nu are capacitatea de a înzestra o celulă cu gene de la alt microorganism şi nici nu poate să transfere funcțiile. Asemenea posibilități au devinit realizbile odată cu implementarea tehnologiei ADN-ului recombinant.

5.3. Ingineria genetică şi apariţia enzimelor recombinante pentru sinteza stereoselectivă

Noile tehnologii pentru descoperirea şi construirea enzimelor constituie motorul utilizării acestora în industria farmaceutică . Stereoselectivitatea este unul dintre avantajele majore ale căilor biocatalizei pentru producţia compuşilor chirali.

Ingineria genetică împreună cu identificarea şi amplificarea genelor structurale relevante au devenit alternative viabile la mutageneză şi la procedurile de screening aleatoriu. Introducerea genelor în organisme prin utilizarea tehnicilor ADN recombinant este o metodă importantă pentru construirea tulpinilor cu genotipul dorit. Efectul net este plasarea genei transferate în noua gazdă pentru a îndeplini un scop biotehnologic specific. Oportunitatea de a introduce gene heterologe şi elemente reglatoare permite construcţia unor configuraţii metabolice cu noi caracteristici benefice. În plus, această abordare înlătură complicaţiile mutaţiilor necaracterizate care sunt obţinute frecvent în urma mutagenezei celulelor. Îmbunătăţirea activităţilor celulare prin manipularea funcţiilor enzimatice, de transport şi reglatorii ale celulei cu ajutorul tehnologei ADN recombinant conduce la obţinerea de tulpini industriale relevante ale microorganismelor.

În ultimele două decade, pentru multe microorganisme industriale au fost identificate şi descoperite - prin intermediul tehnicilor ADN recombinant – grupurile de gene pentru producţia metaboliţilor secundari, în special antibiotice. În ultimul deceniu progresele în domeniile biochimiei, chimiei proteinelor, clonării moleculare, mutagenezei aleatorii şi direcţionate, tehnologiei de fermentaţie, au oferit accesul nelimitat la o varietate de enzime şi culturi microbiene ca procedee în sinteza organică. Acest proces a fost şi mai mult accelerat prin chimia combinatorică, screening-ul biologic de mare capacitate şi design-ul structural al medicamentelor. Cu toate acestea, succesele au fost modeste, parţial datorită dificultăţii în predicţia structurii exacte a proteinei necesare pentru reacţia stereoselectivă a unui anumit substrat.

A fost înregistrat un progres semnificativ în implementarea metodologiei mutaţiilor şi selecţiei. Tehnologia *DNA shuffling* -cunoscută şi sub denumirea de PCR

sexual- este o metodă prin care se propagă rapid mutații genetice benefice într-un experiment direcționat către evoluție, presupunând recombinarea omologă *in vitro* a genelor mutante selectate printr-o fragmentare întâmplătoare şi reasamblare prin PCR .Această metodă care mimează evoluția naturală este implicată în recombinarea artificială a ADN şi o bancă de peptide cu un număr mic de secvențe (1-200) de la fagi (care este disponibilă în comerț) permite selecția rapidă a proteinelor exprimate de gene mutante.

Progresul rapid al ingineriei genetice şi dezvoltarea mai multor tehnici noi ale ADN recombinant ne oferă mijloacele necesare pentru design-ul, modificarea şi proiectarea biomoleculelor naturale. Pentru aplicații industriale, biomoleculele proiectate trebuie să fie stabile şi active pentru utilizare mai îndelungată în condiții neobişnuite, în intervale largi de temperatură, pH şi mediu de reacție. Activitatea şi stabilitatea susținute pot fi necesare în prezența solvenților puternici, substraturilor înalt reactive, concentrațiilor înalte de săruri sau pH-ului extrem. Din acest motiv, eforturile sunt direcționate spre ingineria fiziologiei celulare pentru a obține îmbunătățirea procesului. Obiectivul final al ingineriei metabolice este design-ul şi crearea unor biocatalizatori potriviți, care sunt capabili să producă cantități maxime ale produşilor doriți. De asemenea, un obiectiv important este eliminarea sau reducerea formării produşilor secundari. Selecția genetică ne permite alterarea selectivității biocatalizatorilor, mărirea tipurilor de substraturi şi termostabilitatea, şi conferirea de noi funcții proteinelor existente. De asemenea ne permite optimizarea proceselor în mai multe etape, şi identificarea noilor peptide ligand pentru receptorii biologici şi caracterizarea interacțiunilor ligand-receptor *in vivo* [Taylor şi colab., 2001].

Pentru a încerca rezolvarea problemelor industriale relevante ale proceselor enzimatice, s-au făcut încercări pentru a crea enzime care vor conferi sau îmbogăți proprietăți utile prin utilizarea tehnicilor biomoleculare. Deşi o abordare rațională a modelului bazat pe relația structură-funcție este larg utilizată, abordarea evoluției direcționate este în general preferată pentru multe enzime industriale datorită dificultăților de a lega aplicațiile dorite de proprietățile solicitate. Genomica

funcțională, proteomica, fluxomica şi fiziomica vor contribui semnificativ la dezvoltarea ingineriei căii metabolice.

Bacteriile sunt gazde ideale pentru ADN-ul recombinant. Ele cresc rapid în supa nutritivă şi acceptă ADN-ul unei specii străine pentru a fi copiat împreună cu genele proprii. Multe bacterii posedă ADN extracromozomial (plasmide) care se replică separat de genomul bacterian. Până la jumătatea anilor 1990, *Escherichia coli* a fost gazda dominantă pentru producția polipeptidelor şi proteinelor farmaceutice. Prin utilizarea unei noi perechi ARNt-codon, o aminoacil ARNt sintetază şi un aminoacid, codul genetic al *E. coli* a fost extins pentru a încorpora aminoacizi non-naturali "cu o fidelitate care o rivalizează pe cea a aminoacizilor naturali". În ultimii ani, din punct de vedere economic, producția compuşilor farmacologici de către celulele mamiferelor a depăşit *E. coli*.

Principalele metodele moderne de îmbunătățire a tulpinilor sunt următoarele:

- identificarea şi amplificarea genelor structurale relevante;
- ADN recombinant şi tehnicile ADN recombinant pentru manipularea funcțiilor enzimatice, de transport şi reglatorii;
- mutageneza direcționată, în particular a reziduurilor cu situsuri active;
- mutageneza aleatorie prin diminuarea proteinelor cu selecție;
- clonarea moleculară;
- chimia combinatorială;
- screening-ul biologic de mare capacitate;
- tehnicile shuffling DNA;
- alterarea topologiei proteinelor prin utilizarea mutazelor monomerice sau evoluției direcționate.

Odată ce prin tehnicile de inginerie genetică au început să se obțină microorganisme şi enzime cu nivele dorite de activitate şi alte proprietăți pentru exploatarea industrială, câteva procedee de sinteză stereoselectivă au fost dezvoltate şi îmbunătățite. Aceasta a avut o influență profundă asupra metodelor de fabricație ale unor compuşi farmacologici activi, aminoacizi, vitamine, şi alți compuşi de interes medicinal. Tehnicile de inginerie genetică au permis obținerea pe scară largă a

multor enzime la preţuri scăzute. Biocatalizatorii au fost implicaţi comercial pentru sinteza intermediarilor complecşi ai medicamentelor, substanţelor chimice produse pentru utilizare specializată (specialty chemicals), substanţelor chimice cu valoare monetară scăzută care sunt comercializate în cantităţi mari (commodity chemicals) utilizate în industria alimentară, farmaceutică şi agrochimică [Liese şi colab., 2000].

5.4. Antibioticele β-lactamice

Studiile biosintetice au dovedit că antibioticele sunt derivate din precursori metabolici primari. Exemple ale unor astfel de precursori includ acizii graşi cu lanţ scurt (acetat şi propionat) şi aminoacizii. Genele structurale ale unor astfel de enzime implicate în sinteza antibioticelor au fost clonate şi caracterizate cu succes. În cazul antibioticelor *β*-lactamice, aceste gene includ genele structurale ale L-*δ*-(aminoadipoil)-l-cisteinil-D-valin (ACV) sintetaza. ACV este intermediarul tripeptidic din calea de biosinteză a antibioticelor *β*-lactamice.

5.4.1. Penicilinele

Penicilin acilaza de la *E. coli* a fost larg studiată pentru sinteza antibioticelor semisintetice. Strategiile implicate în îmbunătăţirea expresiei penicilin-acilazei includ schimbarea sursei de carbon, coexpresia penicilin-acilazei cu proteine chaperone, creşterea eficienţei transcripţionale şi translaţionale şi utilizarea combinaţiilor potrivite ale sistemelor gazdă-vector.

Necesitatea dezvoltării sistematice a strategiei optime de expresie pentru supraproducţia penicilin-acilazei la *E. coli* a devenit extrem de relevantă. Aceasta deoarece produsul, acidul 6-aminopenicilanic (6-APA) **18**, format prin hidroliza penicilinei G **17**, este un compus iniţial important pentru sinteza unui număr mare de antibiotice semisintetice *β*-lactamice **19** (fig. 5.4). Vohra şi colab., (2001) au clonat gena penicilin G - acilazei (PGA) (*pac*) într-un vector *asd*+ stabil (pYA292) şi l-au exprimat la *E. coli.* Această tulpină recombinantă a produs 1000 U PGA/g de masă uscată de celule, de 23 de ori mai mult PGA produs de *E. coli* ATCC 11105 parentală. Creşterea semnificativă a producţiei *pac* a fost însoţită de absenţa represiei

catabolitului glucoza, absența necesității inductorilor precum acidul fenilacetic şi izopropil-*β*-D-tiogalactopiranozidul, stabilitatea 100% a plasmidului pRT4 în absența unui marker selectiv în mediul de creştere, şi absența formării corpilor de incluziune. Asemenea proprietăți sunt necesare pentru aplicațiile industriale.

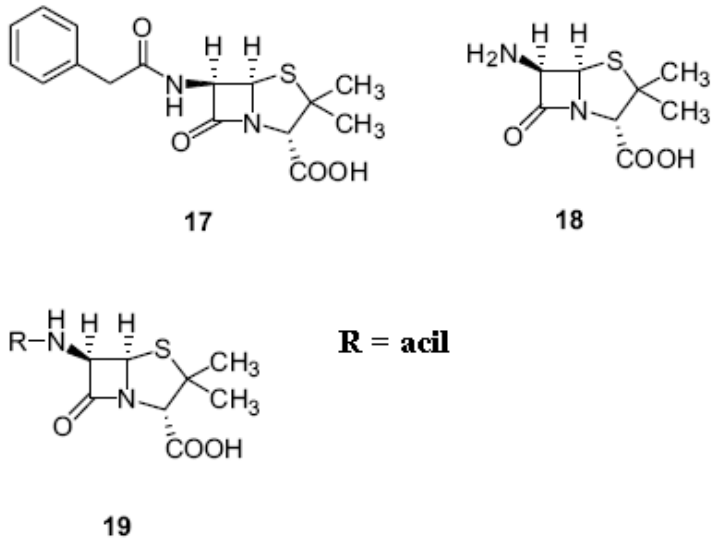


Fig. 5.4. Structurile penicilinei G 17, 6-APA 18 şi penicilinelor semisintetice 19.

PGA de la *E. coli* este o enzimă industrială importantă utilizată pentru producția antibioticelor semisintetice din precursorii *β*-lactamici 6-APA şi acidul 7-aminodezacetoximetilcefalosporanic (7-ADCA) **20**. Au fost dezvoltate diferite sisteme recombinante pentru expresia înaltă în care gena PGA clonată este sub controlul unui promotor puternic şi în consecință PGA este supraprodusă. Expresia genei cromozomiale este represată într-un mediu nesuplimentat cu inductor şi expresia sa necesită prezența acidului fenilacetic (PAA) în mediu. PAA inhibă de asemenea proteoliza intracelulară a pre-proenzimei (ppPA) în citoplasmă. Maresova şi colab., (2001) au îmbunătățit o tulpină recombinantă de *E. coli* – RE 3 (pKA18) care supraproduce PGA din gena PGA a plasmidului utilizând tehnica culturii continue în chemostat. Cultura în chemostat a bacteriilor recombinante conduce la obținerea componentelor pentru crearea unei noi tulpini de producție. În acest caz particular, nouă tulpină recombinantă cu caracteristici modificate a fost construită prin retransformarea gazdei dezvoltate ERE3 cu plasmidul ancestral pKA18.

Penicilin amidaza (acilaza) a fost pentru prima dată descoperită la *Penicilliun chrysogenum* Q176 în 1950. Descoperirea acestei enzime a contribuit în mare măsură la obținerea industrială a antibioticelor *β*-lactamice. În zilele noastre, *E. coli* şi *Bacillus megaterium* sunt tulpini utilizate în special ca sursă de enzimă. Tehnicile de inginerie genetică au fost aplicate încă din anul 1979 pentru a obține tulpina hibridă de *E. coli* 5K, care a avut o activitate de 10x mai mare în ceea ce priveşte producția de enzimă.

Calea lizinei de la *P. chrysogenum* a fost supusă ingineriei genetice pentru supraproducția de *β*-lactam. Acest exemplu demonstrează faptul că dezmembrarea genelor bifurcațiilor divergente a căii biosintetice conduce la canalizarea intermediarilor către produşii finali doriți. Pe de altă parte, amplificarea unei gene specifice care codifică o enzimă prespusă importantă a unei căi biosintetice nu se traduce obligatoriu în tulpini supraproductive din moment ce alte obstacole pot apărea după îndepărtarea primului [Dingermann şi colab., 2004].

Gena penicilin-acilazei (*pac*) din ADN-ul genomic al *E. coli* ATCC 11105 a fost clonată în vectorul pUC19 utilizând tehnicile convenționale [Gumusel şi colab., 2001]. S-a demonstrat că tulpina *E. coli* JM 109 transformată prin această construcție posedă stabilitate plasmidică înaltă. Glucoza manifestă un efect represor asupra producției de penicilin acilază.

Au fost stabiliți parametrii optimi pentru enzima *pac* izolată şi purificată. Lin şi colab., (2001) au observat că producția penicilin acilazei recombinante poate fi crescută la *E. coli* prin creşterea concentrației intracelulare a proteazei periplasmatice DegP. Procesarea periplasmatică şi corpii de incluziune au limitat supraproducția *pac*. Cantitatea acestor corpi de incluziune periplasmatici a fost semnificativ redusă şi activitatea *pac* crescută în urma coexprimării DegP. Stabilitatea *pac* recombinantă nu a fost afectată de expresia DegP. În acest caz, pentru prima data, s-a utilizat proteaza pentru reducerea cantității corpilor de incluziune şi îmbunătățirea producției proteinei recombinante.

Acelaşi grup a exprimat heterolog la *E. coli* gena pac a *Providencia rettgeri* pentru producția la temperatură înaltă a penicilin-acilazei bacteriene. A fost posibilă

producerea enzimei la o temperatură de 37°C, pH-ul culturii fiind aproximativ neutru [Huang şi colab., 2000].

Activitatea de rezistență la antibiotice a fost în mod surprinzător descoperită la fragmente de ADN fără legătură funcțională. Organismul hipertermofilic *Pyrococcus furiosus* nu prezintă activitate *β*-lactamazică. Cu toate acestea, un fragment de ADN care conferă o rezistență la ampicilină foarte scăzută, a fost izolată din biblioteca ADN-ului său genomic. După desfăşurarea a 50 de runde de shuffling şi screening ADN la concentrații de ampicilină crescânde, activitatea de rezistență la ampicilină a acestei clone la *E. coli* a crescut semnificativ [Zhau şi colab., 2002].

5.4.2. Cefalosporinele

A fost dezvoltată şi patentată o tulpină supusă ingineriei genetice de *Pseudomonas cepacia* BY21 (KCTC 8922F), care este capabilă să producă o cantitate mare de acid glutaril 7-aminocefalosporanic. Această acilază catalizează reacția care produce acidul 7-aminocefalosporanic (7-ACA) **21**, care este materia primă pentru antibioticele cefalosporinice semisintetice.

Kim şi colab., (2001) au clonat şi exprimat gena care codifică acilaza glutaril 7-ACA de la *Pseudomonas diminuta* KAC-1 în *E. coli*. Precizăm că *E. coli* BL 21 care poartă pET2B, construcția plasmidică pentru expresia înaltă a genei acilazei glutaril 7-ACA, produce această enzimă în procent de aproximativ 30% din proteinele totale, cu 3,2 U/mg de proteine. Creşterea la o temperatura sub 31°C şi deleția peptidului semnal au jucat un rol major în exprimarea înaltă a genei acilazei 333 a *P. dimunita* KAC-1 în celulele recombinante de *E. coli*.

Acilazele cefalosporinelor sunt un grup important de enzime industriale care hidrolizează cefalosporina C (CPC) **22** şi/sau GL-7-ACA **23** la **21** (fig. 5.5). Zheng şi colab., (2001) au obținut prin inginerie două bacterii ce pot exprima gena care codifică acilaza GL-7-ACA a *Pseudomonas sp.* 130 cu activitate înaltă. Cea mai specifică activitate a acilazei GL-7-ACA a fost prezentă în celulele intacte comparativ cu cea a construcțiilor transformante.

Activitatea specifică a acilazei GL-7-ACA a rămas constantă la cea de-a 50-a generație a mutanților transferați pe o placă de agar.

Tulpina de *Pseudomonas* SY-77-1 care produce GL-7-ACA **23** atunci când a fost supusă unei mutații a condus la obținerea unei tulpini, numită GK-16, a cărei abilitate de a produce GL-7-ACA a fost de 20 de ori mai mare decât a tulpinii parentale. Aceasta s-a dovedit a fi potrivită pentru producția industrială de 7-ACA. Mai târziu, gena amidazei GL-7-ACA a fost sub-clonată în mai multe copii de plasmid pentru a îmbunătăți activitatea de încă 6 ori.

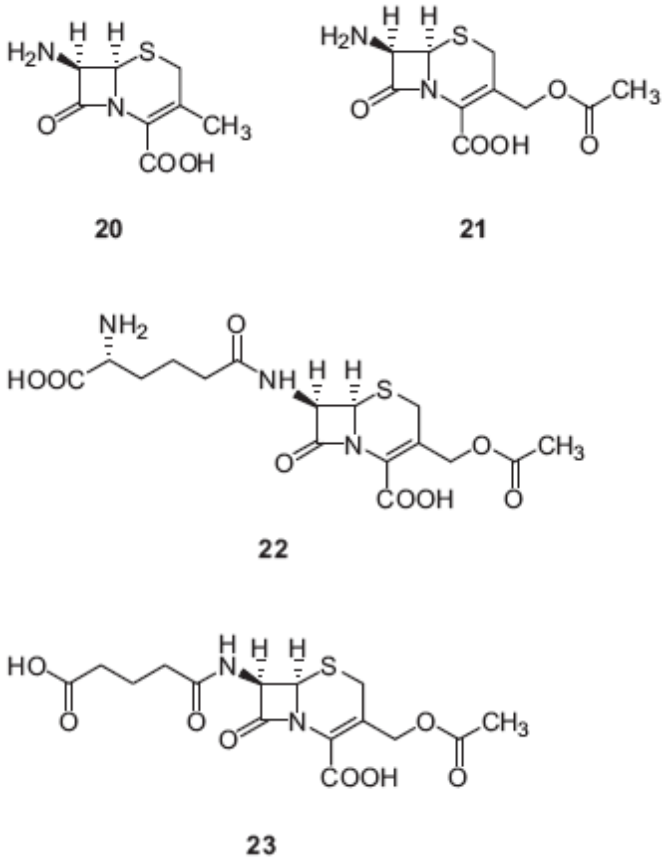


Fig. 5.5. 7-ADCA 20, 7-ACA 21, CPC 22 şi GL-7-ACA 23.

Procesele de producție a cefalosporinelor 7-ADCA şi 7-ACA de către *P. chrysogenum* ce exprimă o enzimă cu activitate intensă au fost studiate timp de câțiva ani şi oferă exemple tipice de inginerie metabolică pentru extinderea spectrului produşilor biocatalizatorilor [Nielsen, 2001]. DSM produce penicilina G/V prin

fermentație cu ajutorul tulpinilor de *P. chrysogenum* care au fost îmbunătățite atât prin metode clasice cât şi prin inginerie genetică.

Conversia *in vitro* a analogilor penicilinei N la cefalosporine a fost pentru prima dată demonstrată la celulele în stare dormantă şi extractele de *Streptomyces clavuligerus* NP1. Sim şi colab., (2001*)* au optimizat rata de conversie a unei surse solubile înalt exprimată de deacetoxicefalosporina C sintetaza a *S. clavuligerus* recombinante NRRL 3585 (ScDAOCS) prin intermediul caracterizării detaliate a necesarului de cofactori. Conversia penicilinei G şi a ampicilinei au fost crescute de 21, respectiv 35 de ori. Excluderea ditiotreitolului (DTT) şi a ascorbatului din reacție a avut un efect benefic asupra produşilor de reacție. De asemenea, sulfatul de magneziu şi clorura de potasiu nu sunt esențiale pentru aceste reacții.

Îmbunătățirea produşilor prin ingineria metabolică a fost demonstrată şi pentru alte sisteme. Skatrud şi colab., (1989) au crescut producția de cefalosporină C de către *Cephalosporium acremonium* cu 15% prin supraexpresia genei cefEF.

Unul din primele exemple care demonstrează importanța ingineriei căii metabolice este cel al producției de cefalosporine. Până în anul 2000, sinteza cefalexinei consta dintr-o etapă de sinteză organică (etapa 1), o etapă de fermentație (etapa 2) şi două etape enzimatice (etapele 3, 4) (fig. 5.6).

Etapa 1:	Conversia benzaldehidei la D-fenilglicinamida
Etapa 2:	Fermentația cu glucidul şi acidul adipic pentru a obține amida acidului adipic 7-ADCA
Etapa 3:	Hidroliza enzimatică a amidei acidului adipic 7-ADCA la 7-ADCA acid adipic
Etapa 4:	Condensarea enzimatică a 7-ADCA cu D-fenilglicinamida pentru a obtine cefalexina

Fig. 5.6. Progresul metodelor de sinteză a cefalexinei

Procesul a fost comercializat de DSM şi este bazat pe productivitatea înaltă a tulpinii de *Penicillium*. Genele enzimelor tulpinilor de *Cephalosporium* au fost implantate tulpinilor de *Penicillium*. Această tulpină supusă ingineriei a fost capabilă sa convertească zaharul direct la jumătate de 7-ADCA. Acest proces, care este mai

eficient, face ca ruta chimică să fie inutilă. Ca urmare, compuşii chimici toxici precum acidul peracetic, diclormetanul, pentacloridul fosforic, clorura de trimetilsilil, trimetilamina clorhidrică, bis(trimethyulsilil) ureea, acidul fenilacetic şi *n*-butanolul, care erau necesare pentru sinteza chimică, nu mai sunt utilizate.

Procesul ce constă din două etape pentru 7-ADCA conduce la o reducere a consumului de solvent cu aproximativ 90%, a reactivilor auxiliari cu 100%, a energiei cu aproximativ 40% şi a deşeurilor cu aproximativ 15%. Recent, Bristol-Myers Squibb a patentat un proces pentru producția directă a dezacetilcefalosporinei C prin cultivarea unei tulpini de *Acremonium chrysogenum* care conține acid nucleic recombinant ce codifică esteraza cefalosporinei *Rhodosporidium toruloides*.

Producția 7-ACA a fost facilitată prin utilizarea tehnicilor de inginerie genetică. D-aminoacid oxidaza (DAAO) este o flavoenzimă înalt stereoselectivă ce catalizează dezaminarea oxidativă a D-aminoacizilor pentru a produce α-cetoacizii corespunzători şi amoniac. Enzima este larg răspândită la mamifere şi eucariote. Numai câteva enzime, precum cele din rinichiul de porc şi din drojdiile *Rhodotorula gracilis* şi *Trigonopsis variabilis,* au oferit o preparare omogenă. Coenzima, FAD redusă, este reoxidată spontan de către oxigenul molecular pentru a forma peroxidul de hidrogen.

Studii detaliate asupra proprietăților DAAO a *R. gracilis* (RgDAAO) au arătat că această oxidază are proprietăți favorabile pentru aplicații industriale. Cea mai importantă aplicație industrială este bioconversia cefalosporinei C în prima reacție a căii de două etape pentru obținerea 7-ACA, iar cea de-a doua reacție o constituie dezacilarea catenei cefalosporinei C de către GL-7-ACA acilaza.

Utilizarea acestei flavozime este deseori însoțită de probleme care provin din procesul de purificare costisitor, turnover-ul scăzut al enzimei şi pierderea coenzimei. Acelaşi grup a creat His-tagged RgDAAO pornind de la o proteină himerică recombinantă cu şase reziduuri de aminoacizi la capătul N-terminal.

Această proteină His-tagged a fost exprimată cu succes la *E. coli* ca o proteină solubilă şi o holoenzimă complet activă. Nu au fost observate în cantități semnificative activități secundare, precum activitate β-lactamazică sau catalazică.

Enzima a fost activă şi a avut o stabilitate termică crescută după imobilizarea covalentă la matrice. Enzima a putut fi utilizată repetat după simpla recuperare din mediul de reacție [Dingerman şi colab., 2004].

Ca şi în cazul obținerii cefalexinei, fabricarea 7-ACA din cefalosporina C prin utilizarea DAAO s-a dovedit a fi un proces de "chimie verde". Utilizarea solvenților clorinați, aditivilor toxici şi a temperaturilor extrem de scăzute sunt evitate. Procesarea în continuare este simplificată datorită purității produşilor rezultați. Faptul că există peste 50 de patentări referitoare la biotransformarea cu DAAO indică semnificația sa industrială.

Tehnicile de inginerie genetică au fost utilizate cu succes pentru modificarea caracteristicilor enzimelor în vederea creşterii producției de medicamente. Esterul p-nitrobenzil **24** al cefalosporinei Loracarbef® **25** este puțin solubil în apă şi dimetil formamida este utilizată ca şi cosolvent. Cu toate acestea, esteraza din *Bacillus subtilis*, care hidrolizează esterul la Loracarbef®, este inhibată de DMF (fig. 5.7).

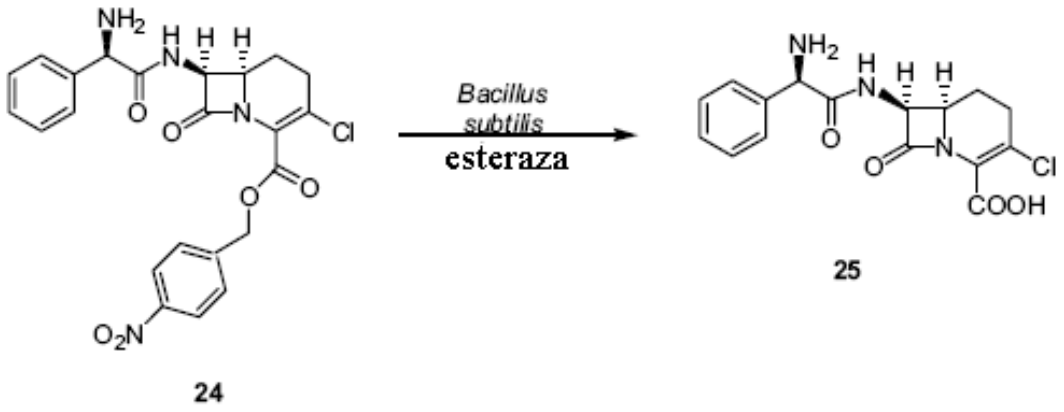


Fig. 5.7. Biotransformarea stereoselectivă în sinteza Loracarbef 25.

Combinația epPCR şi DNA shuffling a condus la generarea unei variante cu o activitate de 150 de ori mai mare comparativ cu tipul sălbatic în DMF 15%. Termostabilitatea acestei enzime a fost crescută cu aproximativ 14°C prin evoluție dirijată [Giver şi colab., 1998].

5.5. Antibioticele poliketide

Antibioticele poliketide sunt compuşi naturali produşi de către organisme eucariote, procariote şi plante. Ele sunt parțial alcătuite dintr-un lanț de atomi de carbon carbociclic sau aliciclic derivat din condensarea acizilor carboxilici. Ele sunt construite din unități simple ale unor structuri specifice ce conțin între 2 şi 5 atomi de carbon. Biosinteza lor de către poliketid sintaza este similară cu biosinteza acizilor graşi, cu condensări repetitive ale tioesterilor acil. Modul în care aceste unități sunt asamblate de către un complex enzimatic determină structura finală a compuşilor produşi. Ele exprimă un spectru larg de activități biologice, incluzând activitate antiinfecțioasă (eritromicina), imunosupresoare (rapamicina) şi carcinogenetică (aflatoxina).

Poliketidele au reprezentat aproximativ 3% din vânzările globale de produse farmaceutice în 1998, cu o valoare estimată de 8,5 miliarde de dolari. In tabelul 5.4 se prezintă microorganismele supuse ingineriei genetice utilizate pentru producția poliketidelor de interes farmacologic.

Tabelul 5.4. Microorganisme supuse ingineriei genetice pentru sinteza poliketidelor

Tulpina obținută prin inginerie genetică	**Produsul, observații**
Streptomyces peucetius SGF107	producție crescută de daunomicină
Saccharopolyspora erytrea recombinantă	producție îmbunătățită de eritromicină
Mutantul ATCC 31780 şi L9 al *Streptomyces avermitilis*	producție crescută de avermectină
Streptomyces coelicolar, clonat şi exprimat cu genele *Sorangium cellulosum*	biosinteza eficientă a agentului anticanceros epotilona
Streptomyces galilaeus, clonat şi exprimat cu genele pentru biosinteza actinorodinei	biosinteza antrachinonelor aloesaporanina II şi dezoxi-eritrolacina

Primul exemplu de generare a unei poliketide noi prin manipulare genetică a genei poliketid sintazei (PKS) a fost raportat în 1990 de către grupul lui Strohl (1997). Clonarea genelor de biosinteză a actinorhodinei la tulpinile producătoare de aclarubicină ale *Streptomyces galilaeus* a condus la biosinteza de antrachinone aloesaponarin II şi dezoxieritrolacina.

Laboratoarele lui Hopwood (1997) au dezvoltat şi utilizat cu succes o abordare combinatorială a generației unui nou tip de produşi PKS II prin combinarea şi potrivirea unor gene diferite ale tipului II al PKS.

Poliketidele semisintetice sunt create prin modificarea poliketidelor bioactive, naturale [Strohl, 1997]. De când microorganismele au început să dezvolte gradat rezistență la poliketide, ingineria genetică oferă mijloacele pentru crearea unei noi diversități şi eficacități.

Antraciclinele precum daunorubicina **26** (daunomicina) şi doxorubicina **27** (adriamicina) (fig. 5.8) sunt antibiotice cu activitate antitumorală importantă. Cu toate acestea, ele sunt foarte scumpe datorită titrurilor scăzute şi a formării unui amestec complex de compuşi de către bacteriile producătoare, *Streptomyces lividans*, conducând la utilizarea unor tehnici subsecvente costisitoare. Rosabal şi colab., (2001*)* au clonat şi secvențiat fragmentul de ADN cromozomial de la *Streptomyces peucetius* SGF-107 producătoare de daunomicină, care activează biosinteza a două antibiotice poliketidice, daunomicina şi actinorhodina.

Secvențierea parțială a ADN-ului fragmentului activator a arătat că există două cadre de citire, ai căror produşi prezintă similarități cu aceia ai altor factori reglatori ai transcripției din familiile MarR şi ArsR. Producția daunomicinei a crescut de 8 ori la tulpina recombinantă. Prezența plasmidului recombinant a fost testată în timpul şi după procesul de fermentație. El a fost evidențiat la sfârşitul procesului de fermentație. Activarea a fost observată la câteva tulpini.

Majoritatea activității în domeniul ingineriei biosintezei poliketidelor s-a concentrat asupra ingineriei biosintezei eritromicinei **28**, care este în mod natural produsă de către *Saccharopolyspora erythrea.* Biosinteza implică numai trei gene gigant, fiecare codificând o proteină de peste 300kDa. Fiecare proteină este în schimb constituită din două domenii ce se repetă inexact şi care pot fi divizate în şase module. De fapt, moleculele noi pot fi generate prin utilizarea diferitelor combinații şi permutări ale acestor modele, precum şi prin introducerea mutațiilor punctiforme în domeniile funcționale.

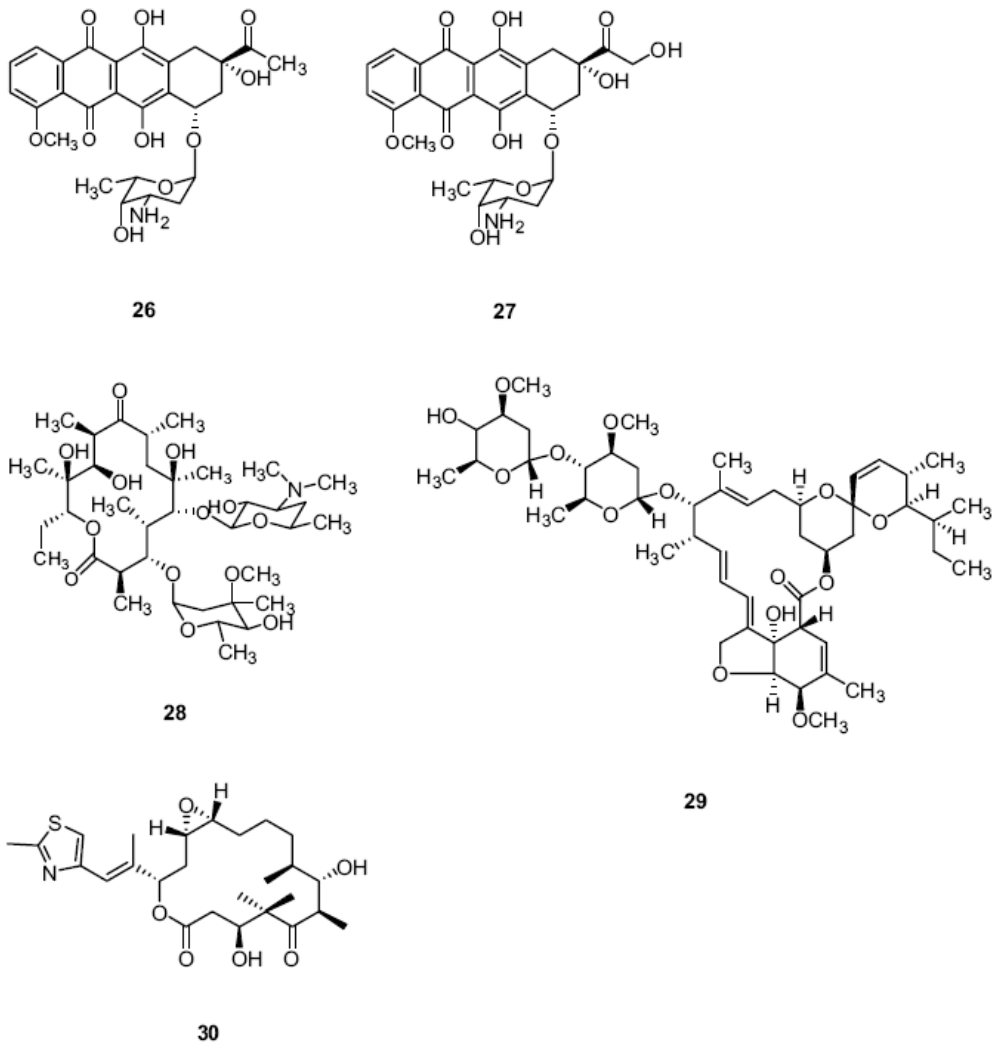


Fig. 5.8. Structurile daunorubicinei 26, doxorubicinei 27, eritromicinei A 28, avermectin A1a 29 şI epotilonei A 30.

Actinomicetele în general, şi speciile *Streptomyces* în particular, au fost considerate ca fiind printre cele mai importante microorganisme din punct de vedere industrial, datorită abilităţii lor de a sintetiza o gamă largă de antibiotice şi alţi metaboliţi secundari. Dintre toţi metaboliţii secundari ce au activitate antihelmintică, avermectina **29** este considerată cel mai important metabolit datorită potenţei comerciale superioare.

Avermectina a înlocuit câteva medicamente convenţionale datorită activităţilor antihelmintice excelente. Câteva studii de biologie moleculară au fost desfăşurate pentru a înţelege calea şi reglarea biosintetică.

Hwang şi colab., (2001) au studiat condiţiile optime de pH pentru transformarea eficientă a protoplastelor şi celulelor intacte la mutanţii de *Streptomyces avermitilis* ATCC 31780 şi L9 producători de avermectină. Ei au descoperit că pH-ul tamponului protoplastului a fost cel mai important factor care influenţează eficienţa transformării. Ei au dezvoltat şi optimizat un proces de electroporare a celulelor intacte fără tratament cu lizozim pentru a compensa scăderea productivităţii ca rezultat al procesului de formare a protoplastelor.

Agentul poliketid anticanceros epotilon **30** stabilizează microtubulii într-o manieră similară taxolului. Calea sa biosintetică a putut fi transplantată la o gazdă cu proprietăţi de producţie mai bune. Astfel, se pare că acest produs natural poate fi transferat la alte gazde pentru a creşte cantitatea şi productivitatea. În timp ce producătorul de epotilon *Sorangium cellulosum* produce numai aproximativ 20mg/L de poliketide, cu un timp de dublare de 16 ore, clonarea şi expresia genelor la actinomicetul *Streptomyces coelicolar* a produs epotilone A şi B la o replicaţie de 10 ori mai rapidă.

5.6. Vitaminele

Tehnicile de inginerie genetică au influenţat metodele de producţie a diferitelor vitamine.

5.6.1 Acidul L-ascorbic (vitamina C)

Microorganismele au jucat întotdeauna un rol important în obţinerea industrială a vitaminei C **38**. Încă din 1923 s-a descoperit că bacteria *Acetobacter suboxydans* avea abilitatea să realizeze oxidarea regiospecifică a D-sorbitol **32**, care a fost obţinut prin reducerea chimică a D-glucozei **31** la L-sorboză **33** (fig. 5.9). Această biotransformare este realizată şi de *Gluconobacter oxydans*. L-sorboza este un intermediar important pentru obţinerea vitaminei C prin acest procedeu, cunoscut şi sub numele de procedeu Reichstein-Gruessner.

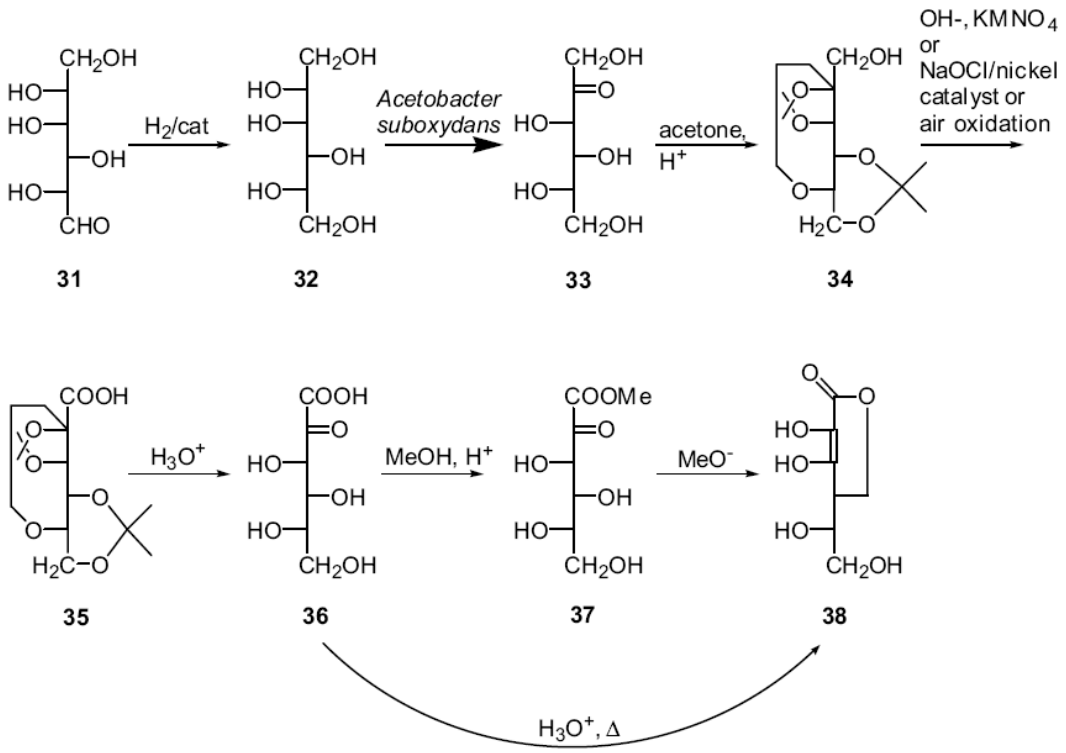


Fig. 5.9. Procedeul Reichstein–Gruessner pentru sinteza acidului L-ascorbic 38.

Procedeul Reichstein-Gruessner este foarte laborios şi prezintă limitări din punct de vedere economic şi al mediului. Din acest motiv, au fost depuse eforturi pentru a descoperi şi dezvolta tehnologii alternative cu ajutorul ingineriei genetice (tabelul 5.5). Sonoyama şi colab., (1982) au descris un proces de fermentaţie în tandem în care oxidarea microbială a D-glucozei la 2,5–diceto-D-gluconat (2,5-DKG) este realizată de speciile de *Erwinia*. Reducerea ulterioară a 2,5-DKG la intermediarul 2-ceto-L-gulonat (2-KLG) este catalizată de speciile *Corynebacterium*. Într-un efort de a restrânge toate aceste etape într-un proces cu o singură etapă, speciile de *Erwinia herbicola* au fost transformate genetic cu gena *Corynebacterium*, care codifică 2,5-DKG reductaza, enzima care catalizează conversia 2,3-DKG la 2-KLG. După optimizarea condiţiilor de cultură, aceste tulpini recombinante de *Erwinia* au produs aproximativ 120g/L de 2-KLG în 20 de ore, cu o producţie molară din glucoză de aproximativ 60%, comparativ cu aproximativ 50% pe calea clasică. Studiile ulterioare au ilustrat viabilitatea economică potenţială a tulpinilor supuse

ingineriei metabolice pentru producția de vitamina C şi au condus la un număr mare de licențe în SUA [Hardy şi colab., 1990].

Tabelul 5.5. Microorganisme supuse ingineriei genetice pentru sinteza acidului L-ascorbic (după Dingermann şi colab., 2004)

Microorganism	Reacția catalizată	Observații
Acetobacter suboxydans *Gluconobacter oxydans*	D-sorbitol la L-sorbitol	Oxidare
Specii de Erwinia	D-glucoza la 2,5-DKG	2 etape, fermentație în tandem
Specii de Corynebacterium	2,5-DKG la 2-KLG	fermentație într-o singură etapă
Erwinia herbicola cu gena *Corynebacterium* ce codifică 2,5-DKG Reductaza	D–glucoza la 2-KLG	
Gluconobacter oxydans T-100 clonat cu gene de la *Gluconobacter melanogenus* sau *gluconobacter oxydans* UV10	D-sorbitol la 2-KLG via L-sorbozonă	cantități îmbunătățite de 2-KLG
Culturi combinate de *Flavimonas oryzihabitans* OA2 şi substraturi *Pseudomonas*	D-glucoza la 2,5-DKG via D-gluconat şi 2-KDG	transformare microbiană cu cepacia 3/27

O altă abordare este convertirea D-sorbitolului sau L-sorbozei la 2-KLG prin intermediul L-sorbozonei. *Gluconobacter melanogenus* şi *Gluconobacter oxydans* UV10 au enzimele necesare, o dehidrogenază sorboză-FAD localizată în membrană (SDH) şi NAD(P)- L-sorbozona DH (SNDH) citoplasmică. Genele care codifică SDH şi SNDH au fost clonate la tulpina *G. oxydans* T-100 producătoare de 2-KLG. L-sorboza a fost consumată complet. Tulpinile recombinante au fost capabile să îmbunătățească cantitățile de 2-KLG la 230%.

Sulo şi colab., (2001) au convertit D-glucoza la 2,5-DKG cu o producție de 92% în 150 de ore prin fermentație utilizând o cultură combinată de două bacterii Gram-negative izolate din sol. Prima tulpină, *Flavimonas oryzihabitans* OA2, produce 2-KDG din D-glucoză via D-gluconat. Cea de-a doua tulpină, *Pseudomonas cepacia* 3/27 converteşte 2-KDG la 2,5-DKG. Această abordare a oferit o nouă posibilitate de a produce acid ascorbic prin transformare microbiană cu substraturi mai convenabile şi oferă căi importante pentru ingineria genetică.

5.6.2. Biotina (Vitamina B_8, Vitamina H)

Un nutrient esențial pentru multe microorganisme şi animale, biotina **39** este obținută printr-o metodă de sinteză chimică complicată şi costisitoare – aşa-numitul proces Goldberg şi Sternbach. Studiile conectate la calea metabolică pentru sinteza biotinei din CoA-pimelică au fost pentru prima dată realizate la *E. coli*. În continuare au fost identificate toate enzimele implicate în sinteza biotinei din acidul pimelic de la *Bacillus sphaericus*. S-a descoperit că mutanții *B. sphaericus* şi *Serratia marcescens*, care erau rezistenți la acidomicin – analogii biotinei şi acidul 5-(2-tienil)-*n*-valeric, secretau cantități semnificative de intermediari ai căii biotinei. Aceasta a condus la izolarea genelor de interes din aceste organisme. Genele implicate în sinteza biotinei sunt organizate în două grupuri, bioXUF şi bioDAYB şi au fost clonate la vectori *E. coli*. După care *E. coli* transformată cu aceste gene a produs concentrații relativ înalte de biotină şi intermediari.

Similar, pentru a creşte şi mai mult productivitatea de biotină a mutanților *S. marcescens*, operonii biotinei au fost clonați pe câteva plasmide. Aceste plasmide hibride purtau fragmente de ADN de 7,2 kb, ce codificau cinci gene ale sintezei biotinei. Reintroducerea la mutanții de *S. marcesens* a permis selecția unei tulpini recombinante ce prezintă un nivel înalt de producție a biotinei [Baets şi colab., 2000].

5.6.3. Riboflavina (Vitamina B_2)

Riboflavina 40 (fig. 5.10) utilizată în nutriția şi terapia umană este produsă atât prin procese sintetice cât şi de fermentație. Deşi bacteriile (speciile de *Clostridium*) şi drojdiile (speciile de *Candida*) sunt producători eficienți, doi fungi asemănători, *Ashbya gossypii* şi *Eremothecium ashbyii*, sunt considerați producători excelenți de riboflavină. Calea de biosinteză a riboflavinei implică o etapă cheie de conversie a ribuloz-5-fosfatului la 3,4-dihidroxi-2-butanon-4-fosfat. Această etapă este catalizată de enzima 3,4-dihidroxi-2-butanon-4-fosfat sintetaza. Această enzimă a fost purificată din drojdia flavinogenică *Candida guilliermondii* precum şi din *E. coli*. Gena sintetazei *E. coli* a fost clonată, secvențiată şi exprimată. Această genă codifică

o proteină de 24 kDa, având aceeaşi mărime ca şi enzima drojdiei. Se aşteaptă ca procesele de fermentaţie fie cele mai utilizate în viitor [Baets şi colab., 2000].

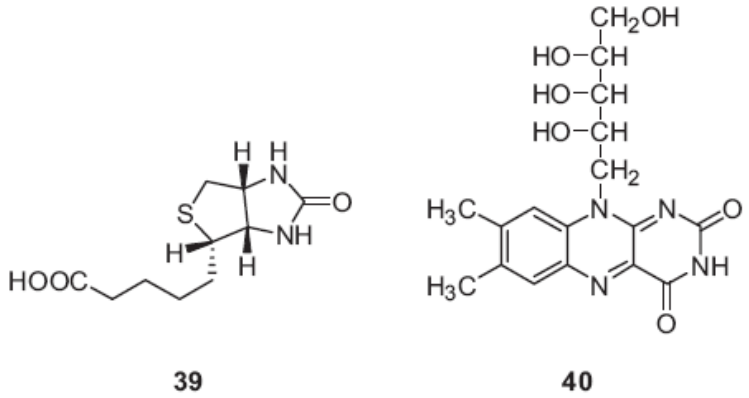


Fig. 5.10. Structurile biotinei 39, riboflavinei 40 şi nicotinamidei 42.

5.6.4 Nicotinamida (vitamina B_3 sau PP)

Un proces microbian pentru conversia 3-cianopiridinei **41** la nicotinamida **42** a câştigat relevanţă industrială în ultimii ani. Hidroliza alcalină chimică a 3-cianopiridinei la nicotinamidă (fig. 5.11) este acompaniată de o cantitate de 4% de acid nicotinic.

Microorganismul utilizat pentru biotransformare este o tulpină de *Rhodococcus rhodochrous* J1 ce exprimă activitate 3-cianopiridinazică (nitrilază). Când enzima este indusă cu benzonitril, amoniacul rezultat este utilizat ca sursă de azot pentru creştere. Acidul nicotinic nu este metabolizat ulterior. Acest microorganism a câştigat importanţă industrială pentru producerea acrilamidei prin hidroliza acrilonitrilului [Petersen, Kiener, 1999].

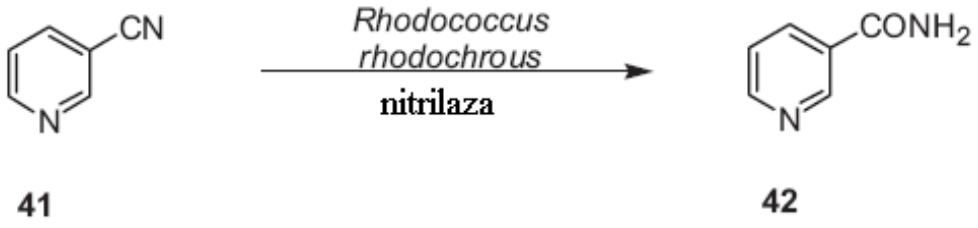


Fig. 5.11. Hidroliza 3-cianopiridinei 41 la nicotinamida 42

5.6.5 Vitamina B_{12}

Sursa naturală primară de vitamina B_{12} o constituie activitatea metabolică bacteriană. În industrie, *Propionibacterium shermanii* şi *Pseudomonas denitrificans* au fost utilizate pentru cantitățile mari produse şi pentru abilitatea lor de a creşte rapid. Tratamente mutagene, precum lumina UV, etileneimina, nitrozometiluretanul, etc., au condus la o îmbunătățire a productivității, dar adăugarea ionilor de cobalt şi frecvent 5,6-dimetilbenzimidazol (5,6-DBI) nu pot fi realizate. Precursorii potențiali precum glicina, treonina şi acidul D-aminolevulinic au un efect benefic asupra sintezei vitaminei B_{12}. S-a descoperit că betaina şi colina au un efect stimulator puternic asupra producției de vitamina B_{12}. Mai mult, mutanții cu porfirină puțină şi mutanții catalază-negativi sunt în general supraproducători de vitamină B_{12}. Fermentația industrială este realizată în două etape: o etapă inițială anaerobă care declanşează creşterea şi biosinteza cobamidei, şi o trecere ulterioară la un proces aerob, care promovează biosinteza 5,6-DBI şi conversia cobamidei la cobalamină. Creşterea *P. denitrificans* are loc în paralel cu sinteza cobalaminei în condiții de aerobioză atunci când 5,6-DBI şi sărurile de cobalt sunt adăugate direct la cultură. Prin tehnici de mutație şi selecție, au fost obținute tulpini care produc peste 150 mg de vitamina B_{12}/L. Mai mult, câteva derivate ale vitaminei B_{12}, precum hidroxicobalamina şi coenzima B11, pot fi produse prin fermentație directă. Câteva tulpini de *P. denitrificans* obținute prin inginerie genetică au fost construite sistematic în laboratoarele Aventis, liderul mondial în producerea vitaminei B_{12}.

5.6.6 Acidul pantotenic (vitamina B_5)

În producția industrială a acidului D-(-)-pantotenic **45**, este realizată reducerea stereospecifică, microbiană, a ketopantoil lactonei **43** la D-(-)-pantoilactona **44** cu celule spălate de *Rhodotorula minuta* sau *Candida parapsilosis* (fig. 5.12).

Condensarea subsecventă cu *β*-alanina conduce la obținerea acidului pantotenic. Takeda Chemical Industries a dezvoltat un proces de fermentație direct pentru acidul D-pantoic **46** şi acidul D-pantotenic **45** (fig. 5.13).

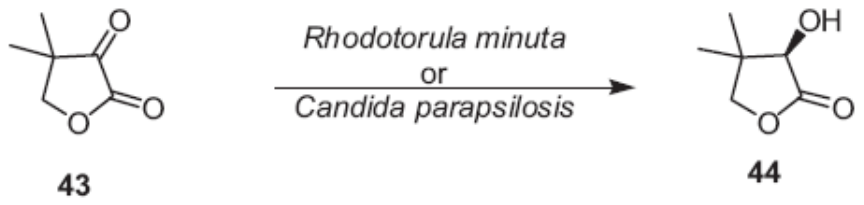


Fig. 5.12. Reducerea microbiană stereospecifică a cetopantoil lactonei 43 la D-(-)-pantoillactona 44

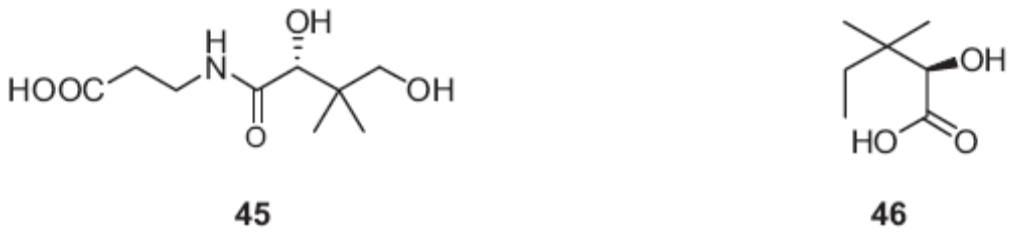


Fig. 5.13 Acidul D-pantotenic 45 şi acidul D-pantoic 46

Câteva genuri de *Enterobacteriaceae (Citrobacter, Klebsiella, Enterobacter* şi *Escherichia*), cu rezistenţă la acidul salicilic şi/sau acidul *α*-cetoizovaleric, acidul acetobutiric, acidul *α*-aminobutiric, acidul *β*-hidroxi-aspartic şi O-metil treonina, au fost selectate ca tulpini cu productivitate mare. Mutanţii de *E. coli* şi tulpinile recombinante, care au fost transformate cu plasmide purtătoare de gene implicate în biosinteza acidului pantotenic, produc cantităţi de acid D-pantotenic din glucoză, *β*-alanina ca precursor [Baets şi colab., 2000].

Degussa a patentat recent un proces pentru prepararea acidului D-pantotenic prin fermentaţia bacteriilor Coryneforme în care secvenţa nucleotidelor ce codifică pentru gena Zwa1 este supraexprimată [Dusch, Thierbach, 2002]. Procesul include următoarele etape:

- fermentarea bacteriilor producătoare de acid D-pantotenic la care cel puţin o genă ce codifică Zwa1 este supraexprimată;
- concentrarea acidului D-pantotenic în mediu sau în celulele bacteriene;
- izolarea acidului D-pantotenic produs.

5.6.7. Vitamina A

Un alt exemplu de aplicație a ingineriei metabolice pentru a converti intermediarii metabolici nativi la produşii finali este producția *β*-carotenului precursor al vitaminei A. Transformarea genetică a *Zymomonas mobilis* şi *Agrobacterium tumefaciens* cu patru gene ale *β*-carotenului a condus la formarea coloniilor galbene pe placa de agar. Aceste colonii conțineau cantități suficiente de precursor [Misawa şi colab., 1990].

5.6.8. Vitamina K (Menaquinona)

Un factor antihemoragic larg utilizat în medicină pentru variate tipuri de simptome hemoragice, vitamina K este produsă prin sinteza chimică. Vitamina K_2 este prezentă numai la bacterii (nu şi la fungi şi drojdii). Bacteriile facultativ anaerobe conțin în particular vitamina K_2 şi omologii săi. *Flavobacterium meningosepticum* a fost identificat ca un producător important al metabolitului. Un mutant al acestui microorganism, care a fost rezistent la inhibitorul biosintezei vitaminei K_2, 1-hidroxi-2-naftoat (HNA) a fost selecționat. Acest mutant produce o cantitate mare de vitamina K_2 intracelulară într-un mediu ce conține □-tirozină şi izopentanol. Procesele de fermentație microbiană pentru sinteza specifică a analogilor vitaminei K pot deveni disponibile pentru comercializare în viitorul apropiat [Baets şi colab., 2000].

5.7. Steroizii

Mutanții speciilor de *Mycobacterium*, care sunt lipsiți de activitatea de degradare a inelului steroidian, au fost utilizați la Schering pentru producția androstendionei şi androstadiendionei la o scală de $200m^3$. Aceşti intermediari sunt utilizați pentru sinteza ulterioară a medicamentelor steroidiene utilizând căile chimice şi biotehnologice. Căile biotehnologice care au obținut semnificație comercială includ hidroxilarea (la pozițiile 11*α* sau 11*β* cu specii de *Curvularia*), dehidrogenarea (poziția *δ*1; hidrocortizon la prednisolon) şi reducerea (17-ceto reducerea). Au fost utilizate de asemenea proteine mediator. Pe baza tehnicilor de inginerie genetică, s-

au produs noi tulpini care au fost utilizate în sinteza compuşilor steroizi. Dumas şi colab., (2002) au produs tulpini cu activitate 20 α-hidroxisteroid dehidrogeneza scăzută. Astfel, cantitatea şi selectivitatea proceselor de biotransformare a steroizilor sunt îmbunătățite. Mai mult, produsul obținut este de puritate înaltă.

5.8. Alte medicamente

5.8.1. L-Dihidroxifenil alanina (L-DOPA)

L-DOPA este un aminoacid optic activ utilizat în tratamentul bolii Parkinson. Metoda tradițională de producere a L-DOPA porneşte de la compusul dihidroxifenil şi implică fie cataliza omogenă, fie biocataliza. Deoarece L-tirozina are o grupare hidroxil fenolică mai puțin decât L-DOPA, eforturile s-au îndreptat către hidroxilarea cu ajutorul biocatalizatorilor. Până recent acest lucru nu era posibil datorită faptului că hidroxilarea subsecventă conducea la formarea contaminanților trihidroxilați. Kramer şi colab., (2001) au clonat genele pentru constituirea 4-hidroxifenilacetat-3-hidroxilazei, monooxigenazei şi FADH2-NADH oxidoreductazei, într-un vector pentru *E. coli*. Genele corespunzătoare hpaB şi hpaC au fost exprimate funcțional şi s-a produs sinteza directă a L-DOPA din L-tirozina.

5.8.2 Crixivan®

Compusul cis-(1S2R)-indandiol **47** este un precursor al unei căi biosintetice pentru producția inhibitorului proteazei virusului imunodeficienței umane Crixivan®, care este forma sulfat a indinavirului **48** (fig. 5.14). Cu ajutorul mutagenezei aleatorii genei care codifică dioxigenaza toluenului din *Pseudomonas putida,* Zheng şi colab.,(2000) au îmbunătățit obținerea de indinavir.

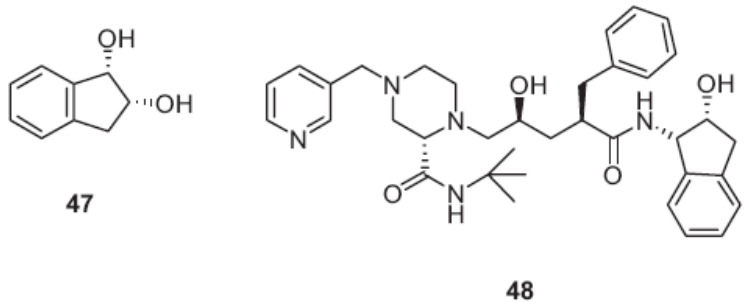


Fig. 5.14. Cis-(1S,2R)-indandiol 47 şi indinavir 48.

5.8.3 Acidul N-Acetil Neuraminic (NANA)

NANA **51**, cunoscut şi sub denumirea de acid sialic, este substratul neuraminidazei virusului influenza. Această enzimă a fost prima enzimă descoperită asociată unui virus. Câţiva analogi ai NANA au fost dezvoltaţi şi unii dintre ei, precum Zanamivir® sunt inhibitori eficienţi ai virusului influenza A. Enzima Neu5Ac (NANA) aldolaza (sintaza) catalizează formarea NANA din N-acetil–D-manozamina **50**, un epimer al N-acetil–D-glucozaminei **49** (fig. 5.15).

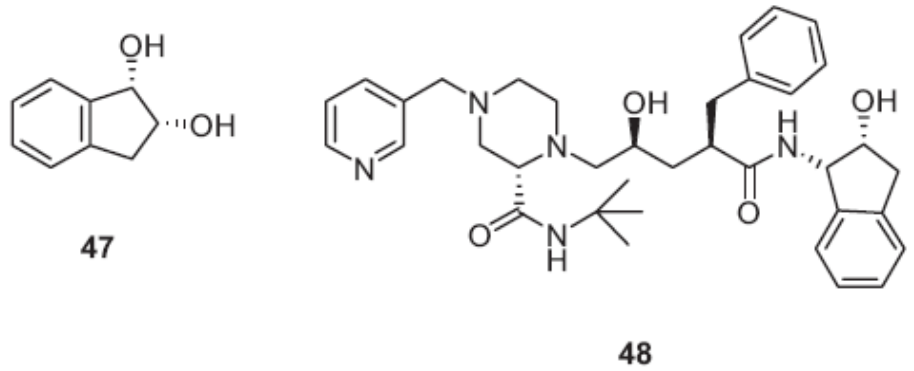


Fig. 5.15 Biotransformarea N-acetil-D-glucozaminei 49 la NANA 51 via N-acetil-D-manozamina 50.

Tehnicile de inginerie genetică şi-au propus să obţină o expresie mai bună a acestei enzime. Mahmoudian şi colab., (1997) au dezvoltat şi imobilizat procesul enzimatic pentru producţia NANA utilizând Neu5ac aldolaza din tulpinile recombinante de *E. coli*. Tulpina de *E. coli* TG1 (pMexAld) a fost construită şi produce cantităţi mai mari de Neu5Ac aldolaza. Sintetaza NANA de la *Neisseria meningitidis* serogrup B a fost obţinută prin expresia genei clonate. Gena siaC a serogrupului B al *N. meningitidis* a fost clonată prin PCR cu ajutorul primerilor derivaţi dintr-o secvenţă disponibilă. Necesităţile substratului sintetazei indică faptul că are un numeroase avantaje faţă de alte aldolaze.

Tehnicile de inginerie genetică au fost introduse în procesul enzimatic dezvoltat pentru NANA de către Kragl şi colab., (1991). Tabata şi colab., (2002) au cuplat bacteriile ce exprimă N-acetil-D-glucozamin 2-epimeraza şi sintetaza acidului N-acetil-D-neuraminic pentru a produce NANA. Gena srl1975 a *Synechocystis* sp. PCC6803, o cianobacterie fototropică, a fost clonată prin PCR şi exprimată la *E. coli*,

iar *E. coli* recombinant prezintă activitate GlcNAc2-epimerazică. Acesta este primul exemplu de clonare a genei GlcNAc2-epimeraza de la procariote.

5.8.4. Inhibitorii biosintezei colesterinei (HMG-CoA Reductase Inhibitors)

Compusul chiral (S)-4-cloro-3-hidroxibutanoate (CHBE) **53** este un element important în sinteza acizilor 4-(2-(ariletil)hidroxifosfinil)-3-hidroxi-butanoici, o nouă clasă de inhibitori selectivi ai biosintezei colesterolului. CHBE a fost produs prin reducerea ceto-esterului corespunzător, esterul acidului 4-cloro-3-oxo-butanoic cu alcoolul etilic (COBE) **52** cu ajutorul unei dehidrogenaze NADPH-dependente de la *Geotrichum candidum* SC 5469 (fig. 5.16).

Cu ajutorul clonării moleculare şi a supraexpresiei genei ce codifică pentru carbonil reductaza NADPH-dependentă a *Candida magnoliae*, aceeaşi biotransformare a fost realizată pentru a obține un produs cu exces enantiomeric 100%. Gena S1 a fost supraexprimată la *E. coli,* iar enzima astfel exprimată a fost purificată şi a avut aceleaşi proprietăți catalitice ca şi enzima *C. magnoliae.* Biotransformarea a avut loc într-un sistem cu două etape utilizând n-butil acetatul.

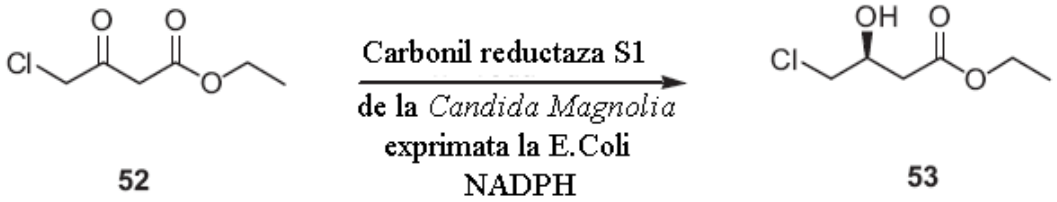


Fig. 5.16 Reducerea stereoselectivă a esterului acidului (R)-4-cloro-3-oxobutanoic cu etanolul (COBE) 52 la (S)-4-cloro-3-hidroxibutanoat (CHBE) 53.

5.8.5. Omapatrilat

Omapatrilat (BMS-186716) **55** este un nou inhibitor de vasopeptidaze în dezvoltare, în care compusul BMS-199541-01 **54** este un intermediar chiral. Pentru a sintetiza BMS-199541-01, a fost izolată o tulpină de *Sphingomonas paucimobilis* SC 16113 care avea o □-lizină ε-aminotransferază nouă.

Gena corespunzătoare (lat) a fost clonată şi supraexprimată la *E. coli.* Un produs al reacţiei de 65-70% a fost obţinut în biotransformarea utilizând biocatalizatori (fig. 5.17).

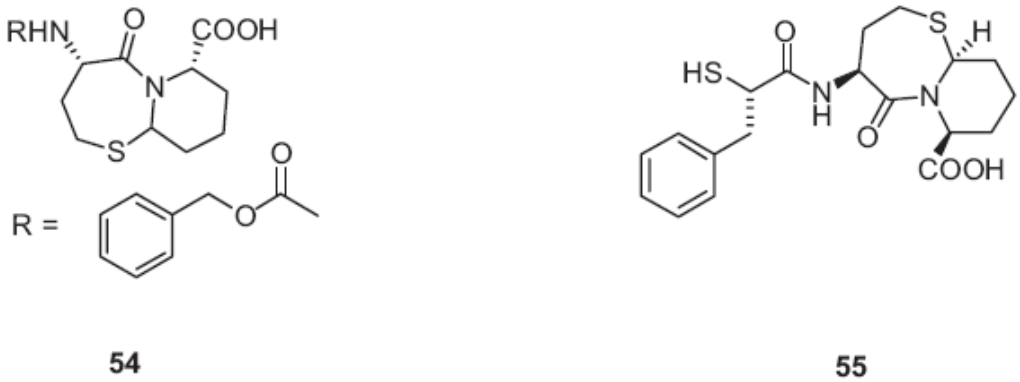


Fig. 5.17 BMS-199541-01 54 şi omapatrilat 55.

5.8.6 Hidromorfona

Sinteza drogului opiaceu semisintetic hidromorfona implică oxidarea microbiană a morfinei **56** la morfinona **57** de către o dehidrogenază, urmată de reducerea dublei legături printr-o transhidrogenază pentru a obţine hidromorfona **58**. Transhidrogenaza nucleotidelor piridinice solubilă (STH) a *P. fluorescenes* a fost supraexprimată la *E. coli*, şi aplicată pentru regenerarea NADH şi NADPH în producţia hidromorfonei (fig. 5.18).

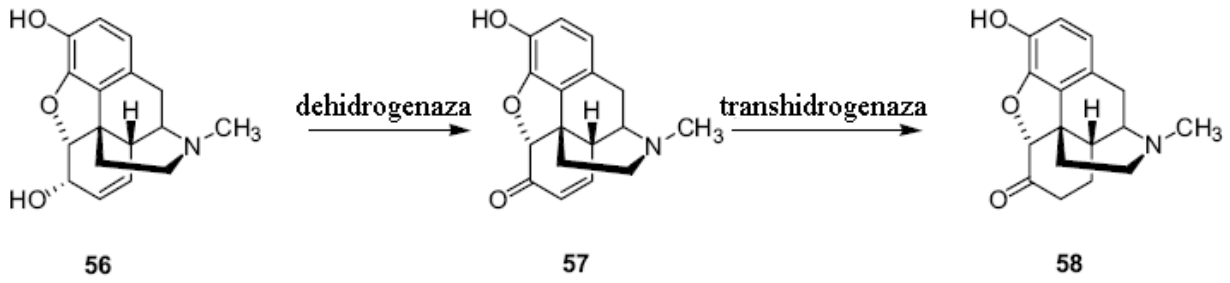


Fig. 5.18 Biotransformarea stereo- şi regioselectivă a morfinei 56 la hidromorfona 58 via morfinona 57.

5.9. Concluzii

Recunoaşterea importanţei chiralităţii moleculelor de medicamente în ceea ce priveşte activitatea farmacologică şi dezvoltarea unor tehnici noi şi mai eficiente pentru ingineria genetică a condus la o nouă abordare a sintezei medicamentelor chirale. Cercetările intensive în câteva arii ale biologiei moleculare crează o mai bună înțelegere a metodelor naturale de biotransformare, pe lângă faptul că ajută la elucidarea cauzelor unor boli. Sintezele stereoselective cu ajutorul microorganismelor recombinante sau biocatalizatorilor izolați de la acestea au oferit un suport excelent pentru eforturile chimiştilor de a sintetiza molecule de medicamente chirale. In 2001, aproximativ 36% din vânzările mondiale de produse farmaceutice în valoare de 410 miliarde de dolari au fost efectuate pentru medicamente cu un singur enantiomer.

CAPITOLUL 6

MEDICAMENTE PE BAZĂ DE ACIZI NUCLEICI

6.1. Introducere

Acizi nucleici conțin toate informațiile despre viața fiecărei plante şi fiecarui animal. Acizi nucleici sunt parte a fiecărei celule sau ființe vii. Acidul dezoxiribonucleic (ADN) este format din două lanțuri dublu catenare de nucleotide. Nucleotidele sunt compuse dintr-o parte glucidică (riboza pentru acidul ribonucleic (ARN) şi 2-dezoxiriboza pentru a ADN), o grupare fosfat şi o bază azotată. În general, doar patru baze azotate diferite pot fi găsite în ADN şi ARN. Acestea sunt adenina, guanina, citozina şi timina în ADN, şi uracil în loc de timină în ARN. Lanțurile de nucleotide, numite oligonucleotide sunt dublu catenare în nucleu. Aceste lanțuri dublu catenare sunt menținute împreună în principal, datorită legăturilor de hidrogen dintre bazele azotate. Perechile de baze sunt întotdeauna guanină-citozină şi adenină-timină (uracil) (fig. 6.1) [Saenger şi colab., 1984].

Informațiile înmagazinate în ADN trebuie să fie traduse în proteine. Prin urmare ADN-ul, trebuie mai întâi să fie transcris în ARN mesager (ARNm), care părăseşte nucleul.

ARNm va fi tradus în proteine la nivelul ribozomilor. Toate aceste procese sunt posibile puncte de „atac” ale medicamentelor bazate pe acizi nucleici. Mai multe concepte sau mecanisme de acțiune ale medicamentelor pe bază de acizi nucleici sunt acum în curs de investigare.

Cel mai important este conceptul antisens (vezi subcapitolul 6.4.1). Alte concepte în curs de investigare sunt conceptul triplului helix (triplex), conceptul ARN-ului de interferență (ARNi) şi conceptul ribozimelor ca medicamente.

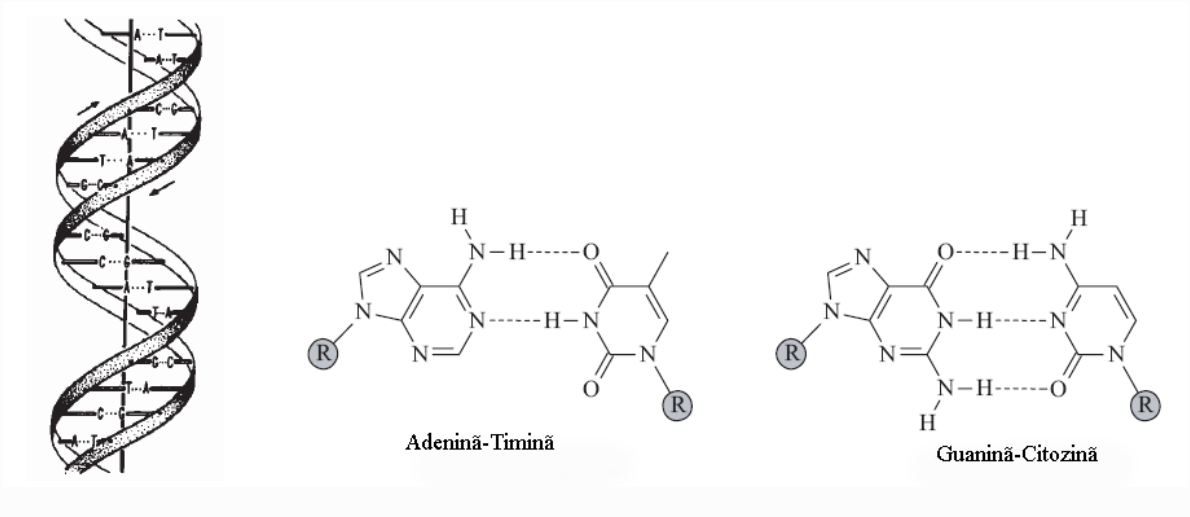


Fig.6.1. Baze perechi Watson-Crick

6.2. Sinteza chimică a oligonucleotidelor

Oligonucleotidele sunt molecule cu lanț lung construite în orice ordine a secvenței nucleotidelor. Sinteza chimică constă în condensarea individuală a nucleotidelor până când secvența şi lungimea cerută este atinsă. Nu este important pentru sinteză dacă nucleotidele sunt ADN, ARN sau blocuri modificate construite. Condițiile de reacție diferă numai în ceea ce priveşte timpii de reacție şi alegerea agenților activatori. Sinteza oligonucleotidelor în fază solidă a fost dezvoltată de Letsinger în 1975.

Principalul avantaj al sintezei nucleotidelor în fază solidă este că purificarea este implicată doar după ultima etapă de sinteză, şi nu după fiecare reacție. În plus, este posibil să se sintetizeze mai mult de un oligonucleotid, în acelaşi timp cu un oligonucleotid sintetizator. De-a lungul ultimilor 25 de ani au fost puse la punct mai multe metode de sinteză a oligonucleotidelor. Pentru fiecare metodă este necesară producerea unor blocuri de nucleotide cu grupuri diferite de protecție. Aceste metode sunt: metoda fosfordiester, metoda fosfortriester, metoda fosfonat H şi metoda fosforamidată. În zilele noastre, numai metoda pe bază de fosforamidați joacă un rol important în sinteza în fază solidă a oligonucleotidelor. Figura 6.2 prezintă ciclul de sinteză al metodei fosforamidaților.

Primul nucleotid fixat pe suport solid, este deprotejat/descoperit în poziția 5', cu ajutorul acidului tricloroacetic (TCA). Apoi, următorul bloc construit este adăugat, activat cu un activator şi cuplat la primul nucleotid. Tetrazolul sau un derivat al său este folosit ca un activator în cele mai multe cazuri. Grupările hidroxil nereactive sunt acoperite cu anhidridă acetică, pentru a opri construirea lanțului de la această poziție, şi acoperirea evită sinteza de secvențe nedorite. Dimerul cuplat este oxidat de un amestec de iod şi apă. Sinteza poate fi oprită după acest pas sau nucleotidul final din lanț poate fi „descoperit" pentru a începe un nou ciclu de cuplare.

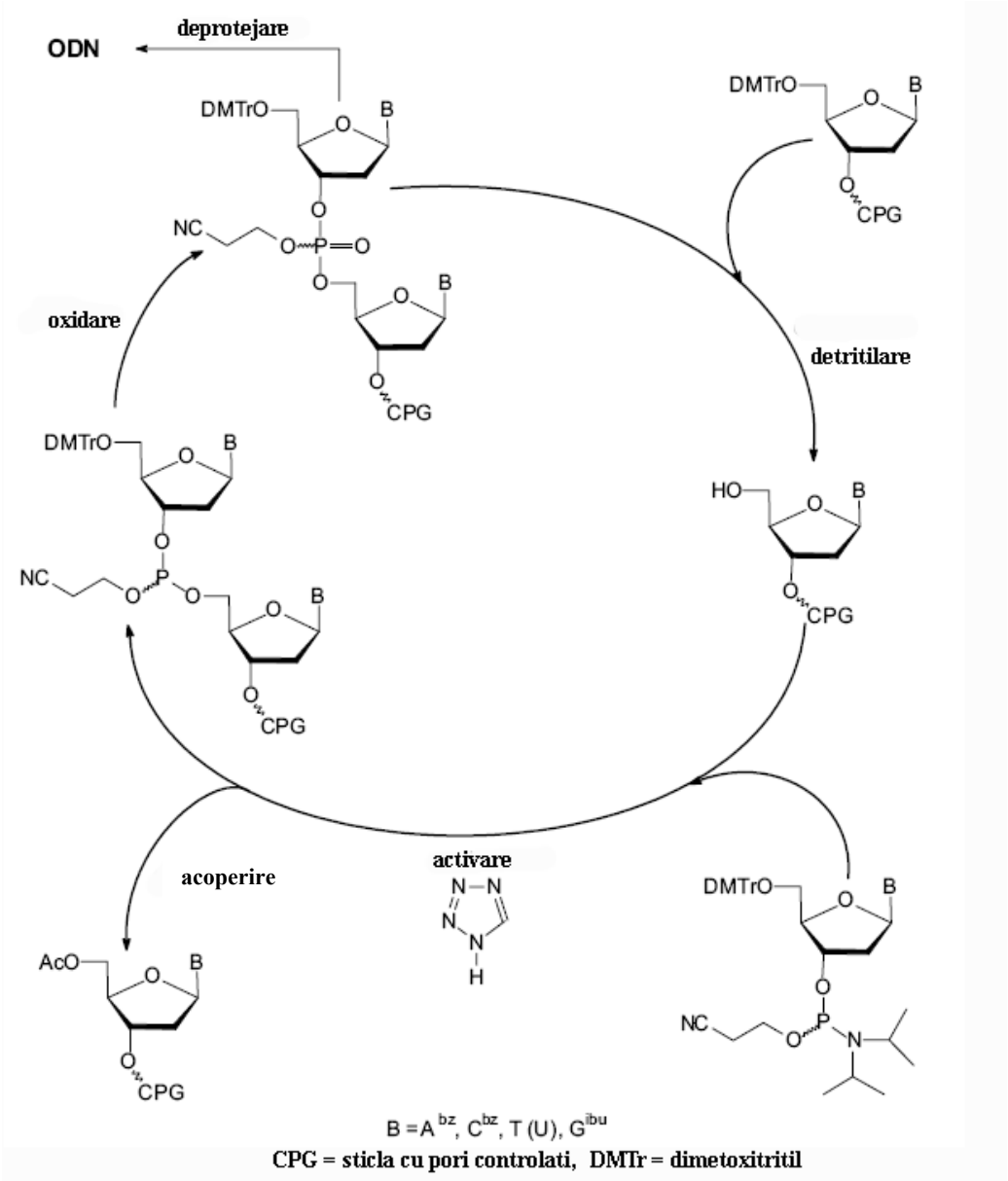


Figura 6.2. Sinteza în fază solidă a oligonucleotidelor

Toate grupurile de protecție, sunt clivate după sfârşitul sintezei oligonucleotidului dorit. Purificarea poate fi realizată prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC) sau prin electroforeză în gel.

O altă posibilitate de a obține oligonucleotide este sinteza enzimatică, în special pentru oligonucleotidele lungi. Sinteza enzimatică utilizând unități construite modificat sunt o alternativă viabilă la sinteza chimică. Încorporarea enzimatică a nucleotidelor trifosfat naturale sau modificate adecvat de ARN polimerazele bacteriofagilor (de exemplu T7) a fost folosită cu succes, deşi această abordare este limitată de acceptarea polimerazei pentru zaharuri, scheletul de susținere al moleculei sau modificări ale bazei.

6.3. Modificări chimice ale oligonucleotidelor

În această subcapitol vom evidenția structura chimică şi proprietățile oligonucleotidelor derivate. Diversitatea chimică a structurii oligonucleotidelor naturale este necesară pentru a face aceste substanțe utile în sistemele biologice. Condițiile necesare pentru ca medicamentele pe bază de acizi nucleici să fie bune sunt următoarele:

- trebuie să fie suficient de stabile împotriva nucleazelor din ser şi din celule;
- ar trebui „să intre” în diferite organe din corp, iar după distribuirea în țesutul dorit, acestea trebuie să fie capabile să penetreze membrana celulară pentru a ajunge la nivelul situsului lor de acțiune;
- trebuie să formeze complexe Watson-Crick sau Hoogsteen stabile cu secvențe țintă complementare sau complexe în condiții fiziologice.

În figura 6.3 sunt prezentate posibilitățile de modificare pentru oligonucleotide. S-au efectuat modificări la nivelul scheletului moleculei, prin modificări ale zaharurilor sau substituția la nivelul părții fosfat, precum şi încorporarea bazelor azotate care sunt substituite sau complet schimbate.

De asemenea, ar trebui să fie menționate: încorporarea conjugaților la capătul 3' sau 5' , precum şi acizii nucleici ce modifică complet scheletul macromoleculei ca

acizii nucleici peptidici (ANPs) sau acizi nucleici inaccesibili (ANLs). În ultimii ani toți aceşti acizi nucleici modificați au fost sintetizați şi testați.

Oligonucleotidele nemodificate sunt larg utilizate ca instrumente în biologia moleculară. Cu toate acestea, în experimentele celulare şi animale s-a observat că oligonucleotidele cu un fosfodiester natural internucleozid legat sunt degradate în ser în decurs de câteva ore, în principal, prin acțiunea rapidă a 3' exonucleazelor de clivare care sunt însoțite de endonucleaze de clivare lente. De asemenea, în anumite țesuturi a fost observată o activitate semnificativă 5'-exonucleazică. Oligonucleotidele modificate chimic vor fi descrise în următoarele secțiuni.

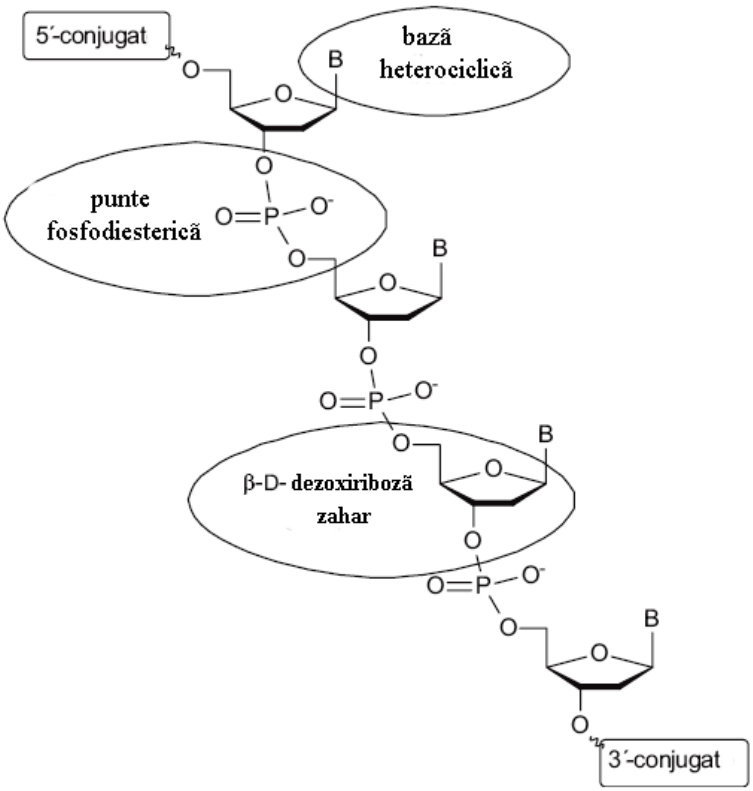


Figura 6.3. Modificarea oligonucleotidelor

6.3.1. Modificări 2'

Oligonucleotidele 2'-O-modificate (fig. 6.4) pot fi considerate ca analogi ai oligoribonucleotidelor. 2'-O-metil-eterul poate fi găsit în stare naturală, de exemplu în ARN în anumite poziții în ARNt, ARNr şi ARNsn (ARN de talie mică). Stabilitatea heteroduplexurilor (ARN)·(2'-O-alchil - ARN) [Freier, Altmann şi colab., 1997]

depinde clar de natura grupării 2'-O-alchil şi creşte în ordinea 2'-O-dimetilalil <2'-O-butil <2'-OH <2'-O-alil <2'-O-metil <20-metoxietoxi. Anterior anului 1987, s-a raportat că 2'-O-metil ARN formează un duplex mai stabil, cu o catenă complementară de ARN decât cu ADN nemodificat sau chiar ARN [H Inoue şi colab., 1987]. 2'-O-alkilribonucleotidele preferă endo conformația C (3') într-un duplex cu ARN. Acest glucid pliat a fost considerat un element structural cheie în duplexurile ARN-ARN, care sunt, în general, mai stabile decât duplexurile ADN-ADN ale aceleaşi secvențe.

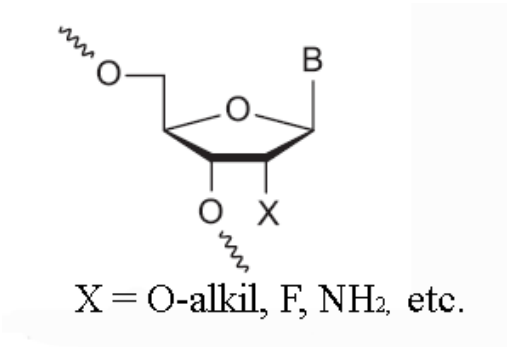


Figura 6.4. Modificări 2' ale oligonucleotidelor

Merită de menționat că modificarea 2'-O-metoxietoxi nu are ca rezultat numai intensificarea afinității de legare la ARN, dar în acelaşi timp face ca oligomerul să fie mai stabil față de degradarea nucleazică. Activitatea RNazei H nu este susținută de modificările 2' -O, astfel încât acestea ar trebui localizate pe flancurile oligonucleotidelor antisens în principal constând din ferestre fosforotioat cu anumite modificări care reduc efectul negativ al fosforotioaților (vezi subcapitolul 6.3.3).

În multe cazuri, în special în aplicații pe modelele animale, chiar flancurile conțin fosforotioați pentru a îmbunătăți stabilitatea lor. Aparent efectele secundare citotoxice ale fosforotioaților nu sunt chiar atât de grave în situația cu o modificare a 2'-O-alchil. În plus, pentru modificări 2'-O-alchil, sunt cunoscute nucleotide 2'-substituite cum ar fi 2'-fluoro-amino sau 2'.amino. Oligonucleotidele 2'-deoxi-2'-fluoro modificate uniform prezintă o afinitate considerabil crescută de legare pentru ARN, comparativ cu nucleotidele ADN, fără a compromite specificitatea bazelor perechi, având în vedere că modificarea 2'-amino destabilizează duplexul cu ARN

[Kawasaki şi colab., 1993; Aurup şi colab., 1994]. Cu toate acestea sunt necesare modificări suplimentare, cum ar fi punțile de fosforotioat, pentru a produce derivați oligonucleotidici suficienți de stabili la nucleaze. Introducerea constantă a zaharurilor 2'-deoxi-2'-fluoro duce la pierderea activării RNazei H.

6.3.2. Alchil-şi arilfosfonații

În ultimii ani au fost investigați mai mulți alchil-şi arilfosfonați diferiți (fig. 6.5) . Principalii reprezentanți ai acestor grupuri sunt metil- şi fenilfosfonații. În afară de fosforotionați, metilfosfonații sunt probabil, cea de a doua clasă investigată de derivați oligonucleotidici cu modificare a fosforului şi ei au fost utilizați precoce pentru inhibarea antisens specifică a expresiei genelor [Miller şi colab., 1985]. În metilfosfonați oxigen fosfatul încărcat negativ este înlocuit de o grupare metil neutră. Legăturile metilfosfonaților sunt foarte stabile la degradarea nucleazelor. Cu toate acestea, o mare problemă este reprezentată de chiralitatea punților metilfosfonaților, care au fie o configurație Rp, fie Sp.

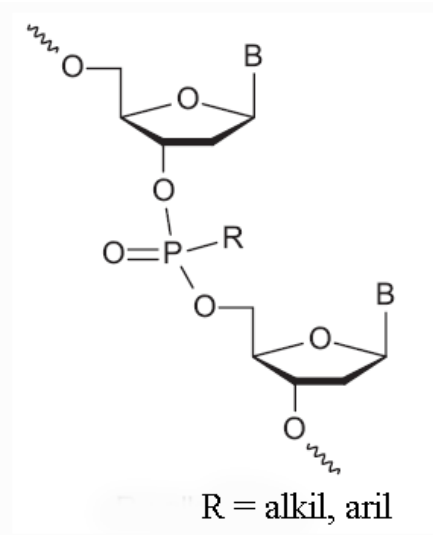


Figura 6.5. Oligonucleotide aril şi alkilfosfonate

Prin urmare, ca şi în cazul fosforotionaților, oligonucleotidele metilfosfonate rezultă de obicei prin sinteza standard, ce constă dintr-un amestec de 2n diastereomeri, unde n este numărul de astfel de legături. S-a arătat că oligonucleotidele scurte cu un schelet metilfosfonat prezintă toate un punct de topire (Tm) mult mai mare decât un

amestec de diastereomeri sau chiar corespunzător oligonucleotidelor fosfodiester atunci când hibridizează cu acizi nucleici complementari.

Oligonucleotidele metilfosfonate modificate uniform nu formează duplexuri cu ARN care induce clivajul RNazei H. Acest lucru poate să limiteze utilizarea lor ca oligonucleotide antisens şi ar putea explica nivelul relativ ridicat de concentrație necesar pentru oprirea efectivă a translației în experimente antisens. Oligonucleotidele himerice care conțin metilfosfonați şi o porțiune de cel puțin cinci până la şapte legături fosfodiester mențin activitatea RNazei H, şi astfel solubilitatea săracă a compuşilor modificați uniform în sisteme biologice poate fi depăşită.

Alkilfosfonații sunt disponibili prin sinteza automată de oligonucleotide utilizând metilfosfonamidați cum ar fi sintonii. Având în vedere că punțile alkilfosfonate sunt mai labile decât legăturile naturale fosfodiester, sunt necesare condiții mult mai uşoare pentru clivajul de pe suportul solid şi pentru „descoperire”. În mod similar, fenilfosfonații şi fenilfosfonotioații care conțin oligonucleotide pot fi preparați din nucleozid-3'-fenilfosfonamidați corespunzători [Dingermann şi colab.,2004]. Afinitatea de legare a arilfosfonaților care conțin oligomeri depinde puternic de secvență, astfel încât unele duplexuri sunt destabilizate de la - 0,3 la – 1,3 K, în timp ce altele sunt stabilizate de la +0,2 la +0,5 K , relativ cu congenerii lor naturali. De asemenea a fost descrisă sinteza pentadecamerilor oligodeoxinucleotidici care conțin doi octilfosfonați legați cu o chiralitate stereoregulară sau stereorandomizată [Mag şi colab., 1996]. Diferența în Tm a fost de - 3,4 K per modificarea stereorandomizată şi de aproximativ - 2,3 până la - 4,0 K per modificare a oligonucleotidelor configurate stereoregular.

6.3.3. Fosforotioații

Nucleazele degradează oligonucleotidele printr-un atac nucleofilic la nivelul legăturii fosfodiester. Înlocuirea oxigen fosfatului nelegat de alți atomi este o modalitate uşoară de a face rezistente oligonucleotidele împotriva nucleazelor. Modificarea fosforotioaților (fig. 6.6) asigură o stabilizare semnificativă împotriva degradării de către nucleaze. Punțile fosforotioat reprezintă de asemenea un centru de

chiralitate. Trebuie menționat, totuşi, că, rezistența la nucleaze depinde puternic de configurația fosforului. Diastereomerii Sp sunt substraturi pentru nucleazele S1 sau P1, în timp ce diasteromerii Rp sunt clivați de fosfodiesteraza din veninul de şarpe. Absorția celulară a oligonucleotidelor fosforotioați este similară oligonucleotidelor fosfodiester. O proprietate importantă a fosforotioațiilor este capacitatea lor de a media degradarea prin RNaza H a ARN-ului după hibridizare.

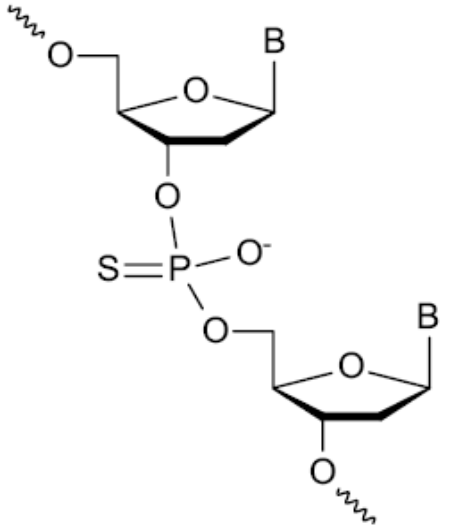


Figura 6.6. Oligonucleotide fosforotioați

Această modificare sporeşte stabilitatea oligonucleotidelor împotriva degradarii enzimatice şi, în acelaşi timp, este compatibilă cu activarea RNazei H. În ciuda tuturor acestor caracteristici promise, fosforotioații prezintă unele dezavantaje. Stabilitatea termică a complexului format cu ARN-ul țintă nu este la fel de stabilă ca cea formată cu oligonucleotide nemodificate. Proprietatea de hibridizare a fosforotioaților diasteroizomerici este suficient de puternică pentru ai putea utiliza în condiții *in vivo*, cu toate că există o pierdere medie de – 0,5 K per legătura de fosforotioat în T*m* pentru amestecul racemic. Mai mult decât atât, pentru motive care nu sunt bine înțelese, oligonucleotidele fosforotioat pot avea o afinitate mult mai mare pentru anumite proteine, cum ar fi cele responsabile de legarea polianionilor. Acest lucru poate duce la efecte secundare nedorite adesea asociate cu citotoxicitate.

De asemenea un fosforotioat, reprezintă o moleculă care poartă un alt centru de chiralitate în comparație cu nucleotidele nemodificate. Fosforotioații Sp şi Rp au

arătat diferite proprietăți fiziochimice. Heterodimeri formați între oligoribonucleotide şi toți fosforotioații Rp au arătat o *Tm*, comparabilă cu heterodimerii mai puțin stabili formați cu toți fosforotioații Sp sau amestecul randomizat, aleatoriu al diasteromerilor [Koziolkiewicz şi colab., 1995]. Complexul ADN-ARN conținând fosforotioații configurației tuturor Rp este mai sensibil la degradarea dependentă de RNaza H în comparație cu hibrizi care au fie toți Sp omologi sau un amestec aleatoriu de diastereomeri. Interesant, 3′exonucleaza prezentă în plasma umană pare a degrada fosforotioații ai configurației Rp, dar nu şi pe cei ai configurației Sp [Dingermann şi colab.,2004].

6.3.4. N3′-P5′ fosforamidați

Oligonucleotidele N3′-P5′ fosforamidate (fig. 6.7) arată o rezistență remarcabilă la nucleaze şi hibridizare puternică, dar nu activează RNaza H. Probabil că se vor face numeroase studii despre inhibarea expresiei genei .

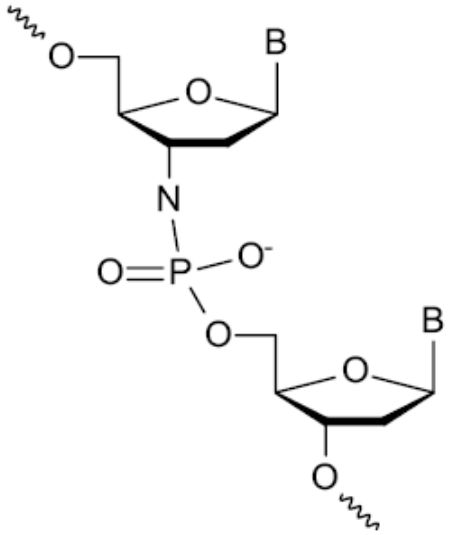


Figura 6.7. Oligonucleotide 3'fosforamidate

6.3.5. Morfolino-oligonucleotidele

Morfolino-oligonucleotidele sunt foarte stabile la nucleaze şi nu sunt sensibile la RNaza H. Ele au fost studiate în special în cercetările privind dezvoltarea embrionară a peştelui zebră şi a lui Xenopus, unde ambele sisteme de compuşi pot fi administrate (injectate) la embrion.

6.3.6 Acizii nucleici peptidici (ANPs,peptid nucleic acid)

Într-un ANP scheletul zaharofosfat este înlocuit de o structură poliamidă bazată pe N aminoetilglicină (fig. 6.8). Un avantaj al ANPs este că ei se leagă cu o afinitate mai mare la acizii nucleici complementari decât omologii lor naturali după regulile perechilor de baze Watson Crick [Egholm şi colab., 1993]. Capătul N-terminal al unui ANP corespunde cu capătul 5' şi capătul C-terminal cu capătul 3' al ADN. În cazul duplexurilor ADN-ANP antiparalel sau respectiv ANP-ARN, Tm este crescută cu aproximativ 1 sau 1,5 K / de bază, respectiv, în comparaţie cu duplexul ADN-ADN sau ADN-ARN. Un alt avantaj al ANP este că împerecherea greşită a bazelor dă naştere adesea la o reducere semnificativ mai mare a Tm în comparaţie cu ADN. ANP este extrem de stabil la nucleaze şi peptidaze. Cu toate acestea, ANPs nu poate stimula clivajul RNazei H. În consecinţă, s-a constatat că ANPs sunt mai puţin eficienţi ca agenţi antisens decât fosfodiesterii şi oligonucleotidele fosforotioat [van der Laan şi colab., 1998].

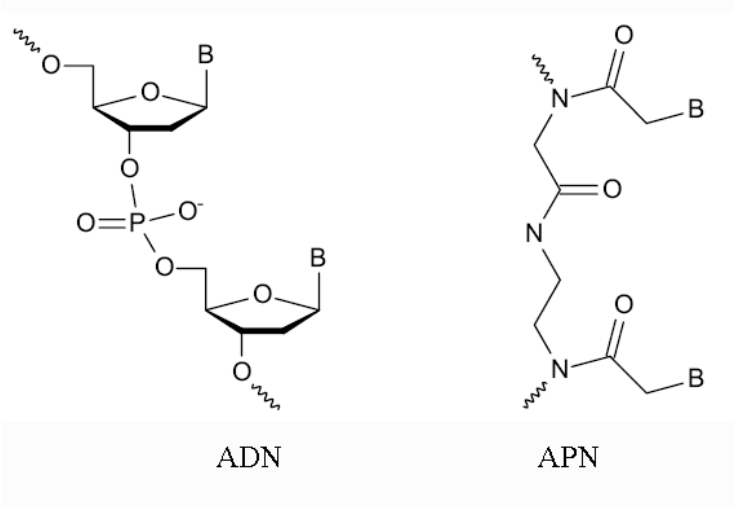


Figura 6.8. Oligonucleotide ADN şi ANP

În contrast, himerele ADN/ANP[19], cu mai mult de patru nucleotide sunt capabile de a stimula clivajul ARN de RNaza H prin formarea unui duplex himeră-ARN. Clivajul ARN se produce la ribonucleotidele cu baze perechi cu partea ADN a himerei. De asemenea, himerele ANP/ADN se supun regulilor Watson-Crick privind legarea de ADN şi ARN complementar [van der Laan şi colab., 1997], aşa cum Tm depinde puternic de raportul ANP/ADN din himeră.

Tm al himerelor 5′-ADN/3′-ANP, în care părțile de ANP şi ADN au lungime egală, se situează aproximativ între cele observate pentru ANP şi ADN pur corespunzător. În contrast cu ANP-ul pur, în condiții fiziologice himerele 5′-ADN/ANP se leagă exclusiv cu orientare antiparalelă la ADN şi ARN. De asemenea, himerele arăta o asimilare celulară mult mai bună decât ANP pur.

6.3.7. Acizii nucleici inacesibili (LNAs, locked nucleic acid) sterici

S-a constatat că ANLs, analogi ai acizilor nucleici cu schelet de susținere reprezentat de fosfoglucide limitate conformațional, pe bază de (3'S,5'R)-2-deoxi-3'5'-etano-βD-ribofuranozil-adenina şi timină (ADN biciclic) formează duplexuri mai stabile decât congenerii naturali corespunzători (fig. 6.9) [Tarkov şi colab., 1993]. ADN-ul biciclic (A10) formează triplexuri mai stabile cu d (T10) din elementul motiv pirimidină-purină-pirimidină decât naturalul d (A10).

A fost descris un nou ADN analog, "ADN- [3.2.1]- biciclic", [Epple şi colab., 1998], ce are un schelet fosfodiester rigid, imitând conformația ADN-ului de tip B , la care sunt ataşate baze azotate pe calea unui lanț deschis de legare flexibil. Deşi ADN-ul [3.2.1] biciclic formează duplexuri mai puțin stabile cu ADN complementar decât cu ADN natural, discriminarea bazelor împerecheate greşit este uşor îmbunătățită, comparativ cu duplexurile de ADN pure. Important, oligomerii de ADN [3.2.1] biciclic sunt rezistenți la degradarea 3' exonucleazei. O nouă modificare cu afinitate de legare neobişnuit de mare afinitate este ANL, în care 2'oxigenul este legat printr-o punte metilen la carbonul 4' formând un nucleozid ribofuranozil biciclic metilen-legat.

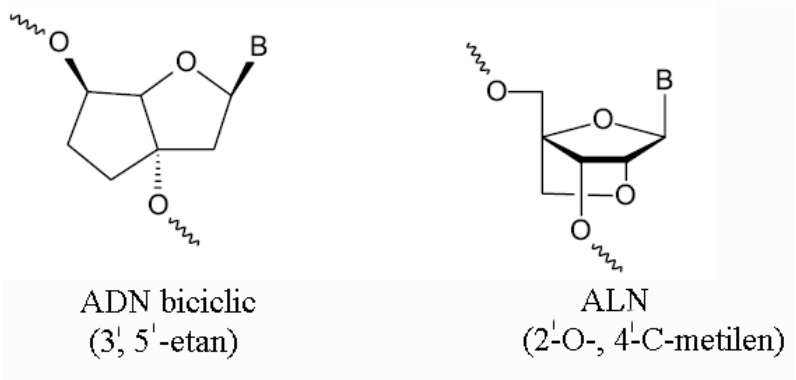


Figura 6.9. Oligonucleotide blocate steric

Conformația glucidică a acestui derivat este blocată la conformația tip N (3'-endo) [Koshkin şi colab., 1998]. O creştere fără precedent de +3 până la +8 K pe modificare în stabilitate termică a duplexurilor cu privire atât la ADN cât şi la ARN a fost raportată când s-a realizat evaluarea secvențelor amestecate ale ANL codificate parțial sau total.

6.3.8. Oligonucleotide conjugate

De asemenea ataşamentul covalent al moleculelor nonnucleozidice fie la capătul 3' sau 5' al oligonucleotidelor poate modula proprietățile oligonucleotidelor antisens. Acest tip de derivație este chimic simplu şi permite modularea stabilității nucleazei, asimilarea celulară şi distribuția în organe a oligonucleotidelor.

6.3.8.1. Conjugații 5'terminal

Conjugarea moleculelor la capătul 5' al oligonucleotidelor se poate face simplu prin cuplarea fosforamiditei sau a unui derivat fosfonat H al moleculei dorite la gruparea 5'-hidroxi a oligomerului, ce rezultă după elongarea lanțului prin sinteză în fază solidă. O gamă largă de liganzi derivați din fosforamidite, cum ar fi fluoresceina, biotina, colesterolul, dinitrofenolul, acridina şi derivații de psoralen sunt disponibili comercial. Alternativ, gruparea terminală 5'- hidroxi a oligonucleotidelor reacționează cu o fosforamidită aminoalkil legată, care după „descoperire” are ca rezultat un aminoalkil nefuncționabil. Funcția amino a oligonucleotidelor poate fi apoi reactivată post-sinteză în soluție cu derivați ai moleculelor activate corespunzător, cum ar fi esteri, izotiocianați sau iodoacetamide.

6.3.8.2. Conjugații 3' terminal

Conjugarea moleculelor la capătul 3' al oligonucleotidelor este convenabilă şi poate fi obținută prin utilizarea suporturilor solide funcționale în mod corespunzător, care în plus poartă o funcție hidroxil de la care lanțul de oligonucleotide se prelungeşte în timpul sintezei în fază solidă.

După ce sinteza oligonucleotidelor este completă, oligonucleotidul conjugat este clivat de pe suportul solid şi este „descoperit” prin tratament cu amoniac. Folosind această metodă, derivații relativ exotici, cum ar fi jumătatea anionoforică a pamamicinei [Uhlmann, 1998], pot fi uşor de introdus. În mod similar conjugării 5' terminale, suporturi solide adecvate 3'-amino-modificatoare sunt disponibile comercial şi permit cuplarea derivaților moleculei activați corespunzător să fie conjugați cu gruparea alkil 3'amino în etapa de dizolvare, postsintetică. Conjugarea la capătul 3' al oligonucleotidelor are de obicei ca rezulat o stabilizare puternică împotriva exonucleazelor 3', care sunt nucleaze predominante în serul uman.

6.4. Mecanismul de acțiune

Încă de la descoperirea structurii ADN-ului de către Watson şi Crick în 1953, mai multe idei diferite despre mecanismele de acțiune ale medicamentelor pe bază de acizi nucleici au fost dezvoltate. Cele mai promițătoare sunt prezentate în figura 6.10. Ele sunt concepte antisens, anti-gene (triplu helix) şi conceptul ARNi, precum şi conceptul utilizării acizilor ribonucleici ca ribozime.

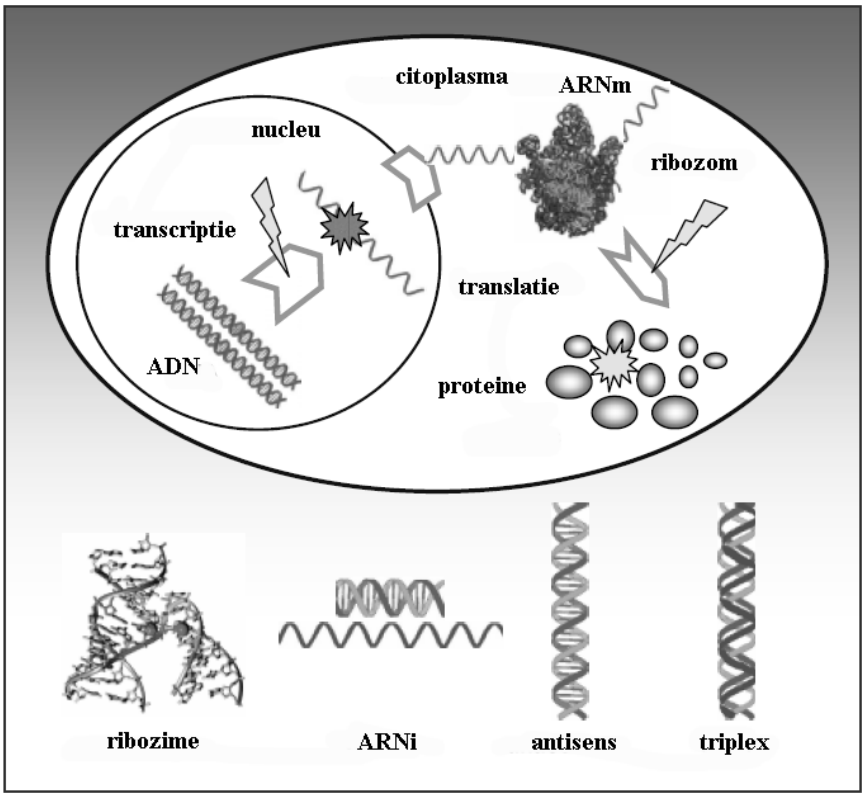


Figura 6.10. Interferența oligonucleotidelor

Mecanismul de acțiune al acestor concepte este discutat în această secțiune. Până în prezent numai medicamentele pe bază de acizi nucleici ce urmează conceptul antisens şi ribozime sunt pe piață sau în faze clinice de testare (a se vedea subcapitolul 6.7).

6.4.1. Conceptul antisens

Conceptul antisens urmăreşte cea mai importantă modalitate de acțiune pentru a modula transferul informației genetice în proteine. Unele mecanisme de acțiune prin care un oligonucleotid poate induce un efect biologic sunt complexe. Oligonucleotidele antisens pot fi clasificate în două mari clase, pe baza mecanismului lor de acțiune: oligonucleotidele RNaz H-dependente, care induc degradarea ARNm de către RNaza H şi oligonucleotide de blocaj steric, care previn fizic sau inhibă splicing-ul sau aparatul translațional. Cele mai multe dintre oligonucleotidele antisens merg pe calea mecanismului RNaz H-dependent.

6.4.1.1. Blocarea sterică

Informația genetică a vieții este stocată în ADN-ul dublu helix şi ADN-ul trebuie să fie tradus în proteine, pentru a obține această informație, adică ADN-ul va fi transcris în ARNm, care va fi tradus în proteine. Oligonucleotidele antisens interacționează cu aceste catene ARNm pentru a bloca translația ARNm în proteine la nivelul ribozomilor. Prin urmare, oligonucleotidele antisens formează în mod special legături de hidrogen cu bazele azotate pe bază de complementaritate după modelul Watson-Crick. Legarea este specific de secvență, astfel încât o împerechere greşită reduce semnificativ stabilitatea duplexurilor formate. În cele mai multe cazuri, în condiții fiziologice, un duplex, cu una sau mai multe împerecheri greşite va fi rapid clivat. De aceea, este necesar să se cunoască exact secvența ARNm care ar trebui să fie blocată. Acum multe secvențe sunt cunoscute, iar odată cu secvențierea întregului genom uman au devenit disponibile mai multe informații cu privire la efectele produse de ARNm corespunzător. Această cunoaştere face posibilă sinteza oligonucleotidelor antisens specifice.

Un oligonucleotid antisens se poate lega la ARNm corespunzător prin legături de hidrogen Watson-Crick, şi oligonucleotidele antisens şi ARNm formează un nou duplex. Translația ARNm la proteine este blocată prin legarea la ARNm şi formarea unui dublu helix care împiedică enzimele translaționale să traducă helixul dublu-catenar. Din cauza stabilității temporare a acestor helixuri duble, au loc modificări ale nucleotidelor pentru a obține helixuri mai stabile în condiții fiziologice pentru îmbunătățirea blocării sterice. Obiectivul acestor studii va fi de a forma un dublu helix, care va avea o durată de viață mai lungă decât cea a ARNm corespunzător cu scopul singular de a optimiza mecanismul de acțiune.

6.4.1.2. Activarea RN-azei H

Cel de-al doilea şi cel mai important mecanism de acțiune al oligonucleotidelor antisens după blocarea sterică este activarea RNazei H [Walder şi colab., 1988]. RNaza H degradează în mod normal primeri ARN în timpul replicări ADN-ului sau excizează selectiv nucleotidele ARN încorporate greşit în catenele de ADN. În heteroduplexurile ADN-ARN, RNaza H hidrolizează selectiv catena ARN. ARNm clivat va fi imediat degradat de exonucleaze în timp ce ARNm intact este protejat de structuri specifice 5' şi 3' împotriva degradării de exo-şi endonucleaze. De asemenea, mecanismul RNazei H explică de ce ARN-ul antisens nu prezintă nici un efect de inhibare a translației. Activitatea de clivare ARN a RNazei H nu va fi indusă de către duplexurile ARN – ARN [Uhlmann, 1990].

Oligonucleotidele antisens modificate chimic trebuie, de asemenea, să activeze RNaza H. În timp ce fosforotioații activează RNaza H, alții ca metilfosfonații sau nucleotidele ANP şi ANL nu activează această enzimă. Activarea RNazei H în fosforotioați depinde de stereochimia atomului de fosfor. Parțial, pentru oligonucleotidele antisens acest dezavantaj al activării nespecifice a fosfodiesterilor sau a oligonucleotidelor fosforotioați este schimbat în avantaj. Încorporarea a cinci sau şase nucleotide modificate într-o catenă nemodificată este de ajuns pentru a activa RNaza H. Cu toate acestea, având în vedere labilitatea oligonucleotidelor nemodificate împotriva nucleazelor şi efectele antisens reduse (observate pentru cei

mai mulți derivați care nu activează RNaza H), dezvoltarea oligonucleotidelor cu schelet mixt sau oligomeri himerici, în care avantajele elementelor structurale individuale sunt combinate, pare a fi modul de abordare ales în prezent.

6.4.2. Conceptul de triplu helix

Primele publicații despre triplu helix au apărut la numai 4 ani după descoperirea de către Watson şi Crick a structurii în dublu helix a ADN-ului . Triplu helixurile/ helixurile triple constau dintr-o singură catenă polipurinică şi două catene polipirimidinice. În timp ce triplu helixurile TxA·T apar rar în celule, triplu helixurile CxG·C nu sunt stabile în condiții fiziologice (fig. 6.11). Citozina în a treia catenă trebuie să fie protonată pentru a forma un triplu helix stabil. Pentru a protona citozina a fost necesar un pH de 6.0. Legarea celei de a treia catenă la helixul dublu Watson-Crick este rezultatul legăturilor de hidrogen Hoogsteen sau Hoogsteen inverse (fig. 6.11 şi 6.12).

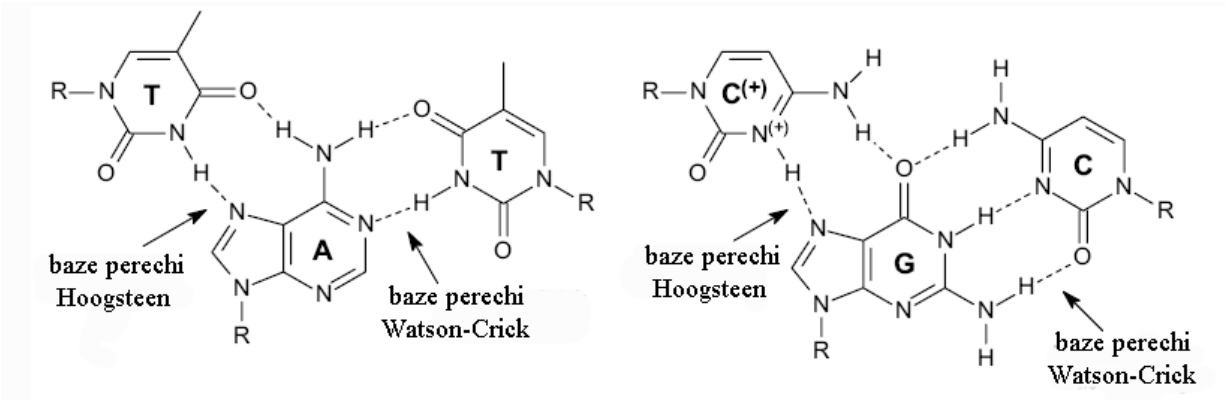


Figura 6.11. Baze perechi Watson-Crick şi Hoogsteen

Oligonucleotide scurte pot lega baze-specific, formând legături de hidrogen Hoogsteen sau Hoogsteen inverse la nivelul incizurii mari a dublui helix al ADN într-un mod specific de secvență. Triadele TxA·T şi CxG·C s-au format într-un mod paralel şi triadele GxG·C, AxA·T şi TxA·T s-au format într-un mod antiparalel (X=Hoogsteen şi · = legături de hidrogen Watson Crick) (fig. 6.12).

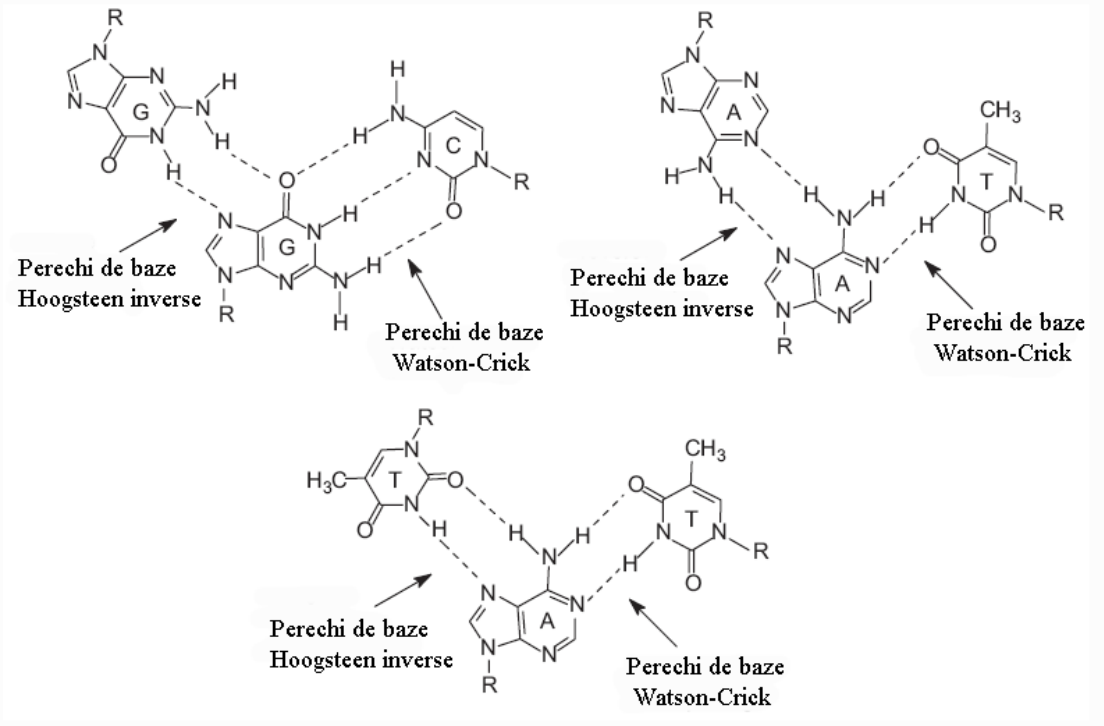


Figura 6.12. Motive triplu helix posibile

Acizii nucleici în triplu helix pot fi utilizați pentru a regla expresia genei *in vivo*. În conceptul triplu-helix (concept anti-genă), cea de-a treia catenă a acidului nucleic ar trebui să hibridizeze cu ADN-ul în dublu helix din nucleu inhibând translația ADN-ului în ARNm corespunzător. Un avantaj major al conceptului de anti-genă comparativ cu conceptul antisens îl constituie faptul că fiecare celulă are doar un set diploid de cromozomi, astfel că ar trebui să fie inhibate numai două secvențe egale de ADN per celulă şi nu sute sau mii de catene ARNm .

Există patru mecanisme posibile de acțiune a acizilor nucleici în triplu helix:

- oligonucleotidele ce formează triplexuri pot interacționa cu poziția de legare al unui component al transcripției sau secvență de replicare;
- schimbarea conformației cauzată de formarea triplu helixului poate perturba legarea unei enzime importante pentru translație;
- oligonucleotidele formatoare de triplex se leagă în aval de o regiune promotor a ARN polimerazei care ar putea inhiba inițierea transcripției;

- oligonucleotidele ce formează triplexuri se leagă la ADN şi pot acționa ca o barieră pentru enzimele de transcripție sau replicare.

Utilizarea *in vivo* a oligonucleotidelor formatoare de triplex sunt similare cu cele pentru oligonucleotidele antisens, adică asigură stabilitatea în medii biologice, absorbția la nivelul nucleului şi farmacocinetica.

6.4.3. Ribozimele

Ribozimele sunt componente catalitice ale ARNs care apar în mod natural sau au fost obținute prin selecție *in vitro* [34, 35]. De cele mai multe ori ribozimele care apar natural catalizează clivarea ARN şi reacțiile de legare.

Vom analiza ribozimele de tip *cap de ciocan* şi *agrafă de păr* care aparțin clasei de ribozime mici (fig. 6.13-6.15) [Sigurdsson şi colab., 1998; Carola şi colab., 1999]. Ribozimele s-au bucurat de o atenție considerabilă, din cauza posibilei lor sinteze chimice, şi în special, pentru încorporarea analogilor nucleotidelor.

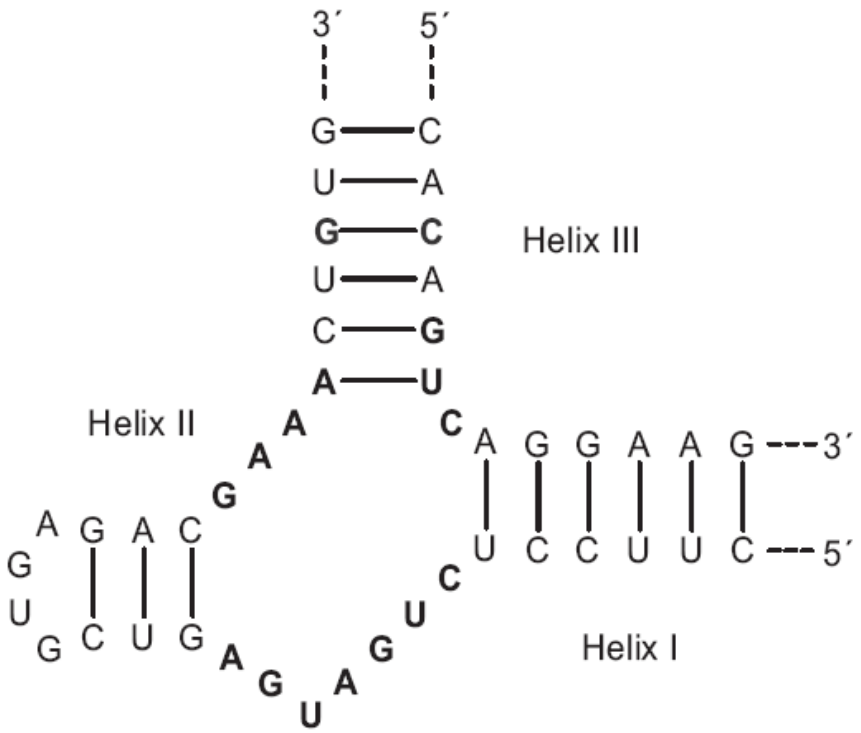


Figura 6.13 Structura schematică a unei ribozime de tip cap de ciocan

De asemenea, ribozimele sunt implicate în inhibarea expresiei genei la nivel de ARN. Aceste ribozime au fost observate inițial ca motive structurale în anumiți viroizi patogeni ai plantelor pentru auto-clivarea ARN catenar [Symons, 1992]. Acest clivaj este o reacție intramoleculară de transesterificare, care ulterior a fost utilizată în reacții intermoleculare prin plasarea substratului şi părții ribozimelor în molecule de ARN separate [Uhlenbeck, 1987]. Astfel, a devenit posibilă analiza ribozimelor care din punct de vedere cinetic, asemănător unor enzime convenționale, permit o mai bună înțelegere a relației structură-funcție. Mai mult, separarea substratului de ribozime le fac potrivite pentru clivarea oricărui ARN şi adecvat pentru inhibarea specific de secvență a expresiei genei [Bramlage şi colab., 1998].

6.4.3.1. Structura şi mecanismul de reacție

Structura de tip cap de ciocan a ribozimelor a fost determinată prin cristalografie cu raze X în stare bazală la fel ca şi în stadiul premergător construcției stării de tranziție a reacției [Scott şi colab., 1996].

În figura 6.14 este reprezentată imaginea bidimensională a ribozimei cap de ciocan complexată cu un substrat, iar în figura 6.15 apare structura ribozimei în agrafă de păr.

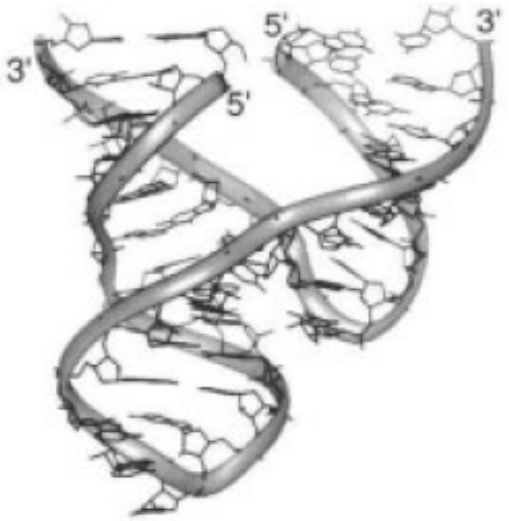


Figura 6.14 Structura unei ribozime de tip cap de ciocan folosind raze X

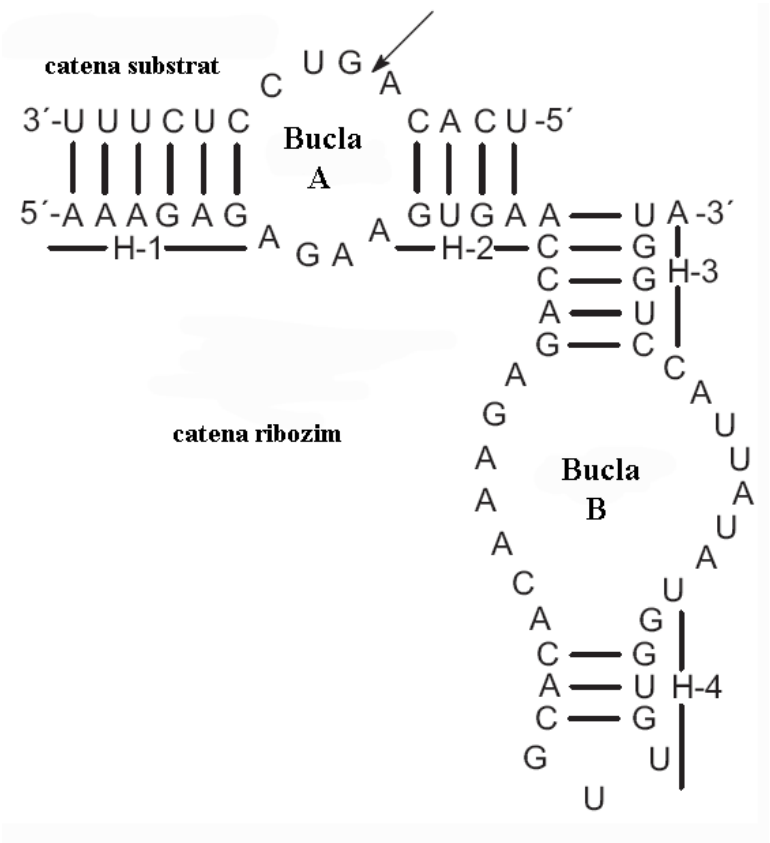


Figura 6.15 Ribozimă de tip agrafă de păr

În cele mai multe studii se arată că ribozimele sunt pregătite prin sinteză chimică să permită introducerea de nucleotide modificate în anumite poziții. Ribozimele conțin un miez central cu nucleotide neschimbate, un helix II care stabilizează miezul şi două brațe de legare cu substratul, care formează helixurile I şi III. Magneziu este necesar pentru o activitate optimă şi unul din rolurile ionilor metal este de a induce modificări conformaționale pentru a îmbogăți structura catalitică.

Ribozimele catalizează o reacție fosforil de transesterificare a 3',5' fosfatului internucleotidic al substratului la 2', 3' fosfat nucleozidul ciclic care are ca rezultat clivarea legăturii internucleotidice (fig. 6.16) [Kuimelis şi colab., 1998]. Reacția este specific de secvență, în care clivajul se produce la nivelul 3' al tripletului din formula generală NUH în care N este orice nucleotid, U este uridină şi H este orice nucleotid cu excepția guanozinei. Ținta unui anumit triplet NUH de clivare în ARN este determinată de succesiunea, secvența brațelor de legare a ribozimelor care trebuie să fie complementară cu secvențele din amonte şi din aval ale tripletului pentru a forma complexe ribozimă-substrat.

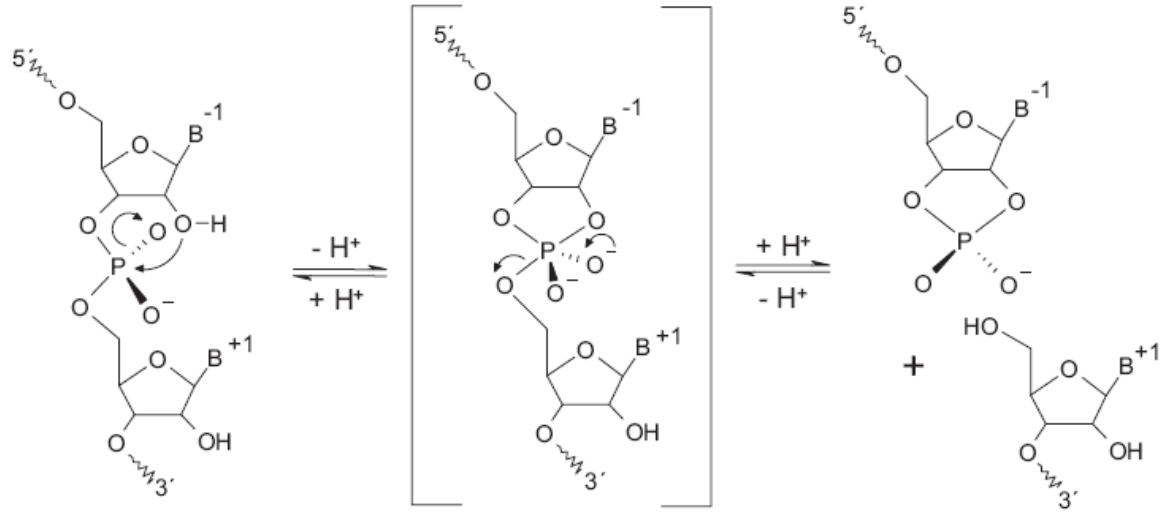


Figura 6.16. Mecanismul clivării ribozimelor

Ribozima este clivată cu o inversare a configurației fosforului, indicând astfel mecanismul de intrare pentru reacția de transesterificare [Yoshinari şi colab., 2000]. Mecanismul favorit pentru ribozima cap de ciocan se realizează în prezența unui ion metalic, care are un rol activ în cataliză. Cu toate acestea există posibilitatea implicării unui grup funcțional al unei baze nucleotidice,care este mecanismul favorit pentru ribozimele în agrafă de păr. Astfel grupările funcționale ale nucleobazelor pot acționa, în principiu, ca şi catalizatori generali pentru acizi-baze.

6.4.3.2. Specificitatea tripletului

Ribozimele naturale clivează 3' din tripletele NUH. Structura cu raze X a fost realizată nu numai în forma de bază, dar de asemenea aproape de starea de tranziție. Aceasta pune accentul pe dinamica sistemului, care trebuie să adopte structura activă prin clivaj conformațional încă necunoscut. Cu toate acestea, eforturile de a obține ribozime cap de ciocan cu specificitate de clivaj modificată au avut mai multe reuşite. O ribozimă ar putea fi selectată să cliveze 3' la NUR unde R poate fi guanozina sau adenozina [Vaish şi colab., 1998]. Acesta arată că secvență specifică pentru clivajul NUG este foarte limitată. O caracteristică interesantă a acestei ribozime o constituie capacitatea sa de a cliva triplete în cazul în care U centrală poate să fie C sau G, care diferă considerabil de ribozimele convenționale de tip cap de ciocan ce are cerințe

stricte pentru U centrală. Cu toate acestea, ribozimele noi extind spectrul situsurilor de clivare din ARN, lucru care este important pentru inhibarea expresiei genei.

6.4.3.3. Stabilizarea ribozimelor

Ribozimele sunt uşor hidrolizate de RNaze care sunt deosebit de active în ser. Când ribozimele sunt implicate exogen pentru inhibarea expresiei genei, ele vor veni în contact cu serul şi, prin urmare, stabilizarea lor împotriva unei astfel de degradări este o condiție esențială pentru producerea cu succes a medicamentelor. O protecție simplă împotriva RNazelor se realizează prin îndepărtarea grupării 2' -OH, menținând-o în acele poziții, care sunt esențiale pentru activitatea catalitică a ribozimelor. Într-adevăr, schimbarea ribozei a nucleozidului pirimidină cu 2'-fluoro-2'-dezoxiriboză va creşte considerabil timpul de înjumătățire, cu o mică scădere a puterii catalitice [Pieken şi colab., 1991]. Acest lucru a fost îmbunătățit prin înlocuirea uridinei din pozițiile 4 şi 7 cu 2'-amino-2'-deoxiuridina . Ulterior acest lucru a arătat că gruparea amino poate fi inclusă în toate pozițiile nucleozidului pirimidină cu efectul dorit [Beaudry şi colab., 1999]. De asemenea alkilarea grupării 2'-OH asigură protecția împotriva degradării şi ea poate fi încorporată în toate pozițiile (în afara de nucleozidele purinice din centrul regiunii), fără afectarea activității [Jarvis şi colab., 1996]. Degradarea de către exonucleaze poate fi prevenită, fie prin introducerea de fosforotioați sau nucleotide inversate cu o legătură 3',3'. Combinarea acestor modificări creşte timpul de înjumătățire al ribozimelor de la câteva minute la zile fără afectarea gravă a capacității catalitice. În concluzie, problema stabilizării ribozimelor împotriva degradării nucleazice poate fi considerată rezolvată.

6.4.3.4. Inhibarea expresiei genei

Pentru suprimarea expresiei genei, ribozimele de tip cap de ciocan şi, într-o măsură mai mică, cele în agrafă de păr au fost investigate, şi numeroase exemple de aplicații de succes au fost descrise [Klebba şi colab., 2000]. Aceste abordări pot fi împărțite în două categorii în funcție de modul de distribuire a ribozimelor în celule. Prima abordare, descrisă ca aplicație endogenă, constă în clonarea secvenței pentru

ribozime după un promotor potrivit într-un vector, fie o plasmidă sau un vector retroviral. După transfecție sau transducție, ribozima este transcrisă în celule pentru a-şi găsi ARNm țintă. Această abordare a fost adoptată de mai multe laboratoare şi avut succes, de exemplu, în interferența cu replicarea HIV [Muotri şi colab., 1999]. Un avantaj al acestui mod de transmitere este că gena poate fi integrată stabil în ADN-ul gazdei, ca într-un protocol de terapia genetică. De asemenea, odată integrată, aprovizionarea ribozimelor devine permanentă. Cu toate acestea, alegerea vectorului este esențială, în special pentru om, unde siguranța vectorului este o preocupare considerabilă. Printr-un alt mod de distribuție exogenă, ribozimele sunt pregătite, fie prin sinteză chimică, fie prin transcriere şi sunt adăugate în celule de la exterior.

6.4.3.5. Colocalizarea

Un aspect important pentru o interferență eficientă cu expresia genei este colocalizarea ribozimelor cu ARN-ul lor țintă. În acest sens, disitribuția endogenă are avantajul că ribozimele pot fi direcționate spre nucleu sau spre citoplasmă, fie prin alegerea promotorului sau prin combinarea cu semnale de localizare subcelulară [Lee şi colab., 1999]. Colocalizarea ribozimelor şi a țintei în nucleol demonstrează convingător acest punct de vedere [Michienzi şi colab., 2000]. În prezent, ribozimele sintetice concepute pentru distribuție exogenă pierd aceste semnale şi localizarea nu poate fi dirijată. Cu toate acestea se speră că ataşarea de peptide semnal, cele importante pentru importul nuclear, ar putea ameliora această situație. Modificarea chimică poate influența aparent o anumită localizare. Astfel, grupuri de fosforotioații, introduse pentru a realiza stabilitatea nucleazelor, direcționează preferențial ribozimele spre nucleu, cu toate că interferența cu expresia genei pare să aibă loc în citoplasmă [Bramlage şi colab., 1999].

6.4.4 ARN-ul de interferență (ARNi)

O nouă abordare pentru ARNm țintă este denumită silenționarea genei postranscripționale sau ARNi [Fire şi colab., 1998; Tuschl şi colab., 2002] (fig. 6.17).

ARNi este un procedeu prin care ARN dublu catenar ţinteşte ARNm pentru clivare într-un mod dependent de secvenţă. Mecanismul ARNi implică iniţial prelucrarea ARN-ului dublu catenar de lungime mare (în jur de 500-1000 nucleotide) în fragmente de „declanşare " de 21 – 25 bp ' [Elbashir şi colab., 2001] de către un membru al familiei III de RNaze ale nucleazelor numite DICER [Hammond, 2001]. Când sunt încorporate într-un complex de nucleaze larg, multicomponent numit RISC (complex de silenţionare ARN indus), catenele prelucrate formează "o secvenţă ghid" care are ţintă RISC la secvenţa ARNm dorită şi contribuie la distrugerea sa [Ketting şi colab., 2001]. ARNi a fost folosit cu succes pentru silenţionarea genelor în diferite sisteme experimentale, incluzând petunia, planta de tutun, neurospora, Caenorhabditis elegans, insecte şi peştele zebră. Utilizarea de ARN dublu catenar lung pentru silenţionarea expresiei în celulele de mamifere a fost încercată, în mare măsură fără succes [Yang şi colab., 2001].

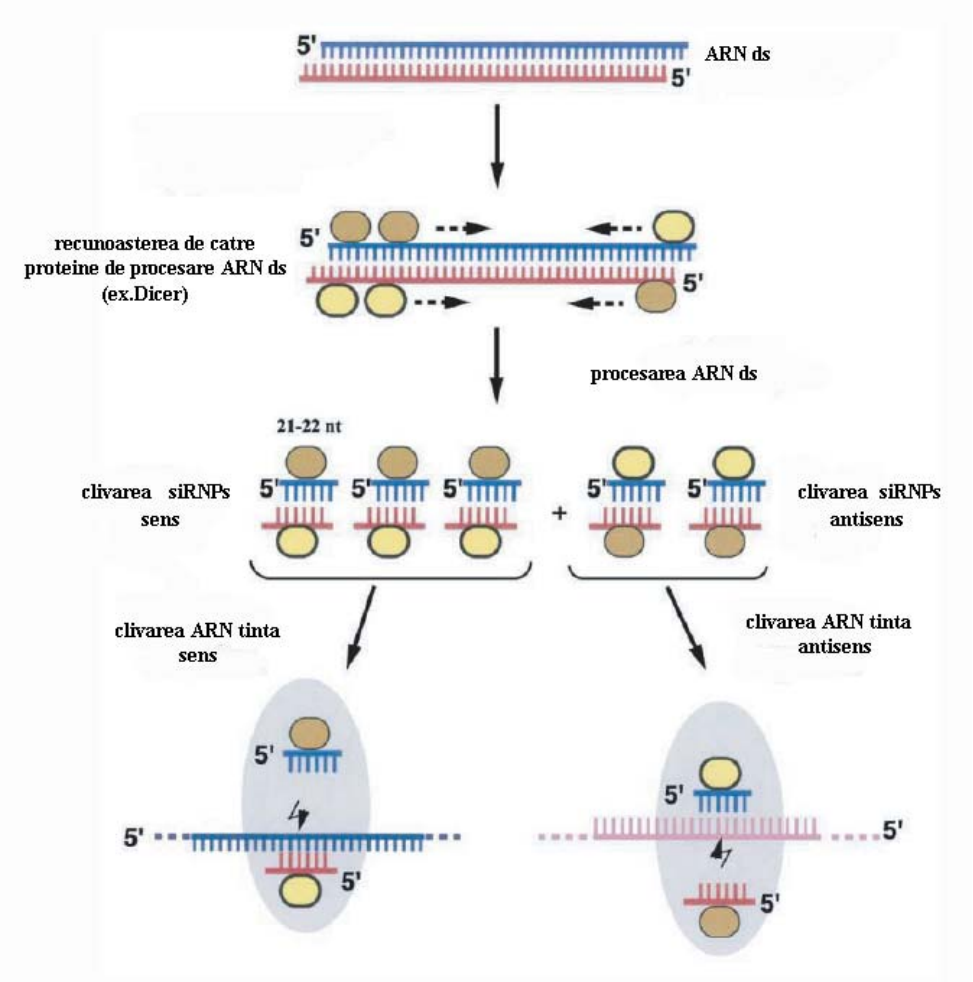


Fig. 6.17. Mecanismul ARNi

Mai multe lucrări recente, folosind interferența scurtă ARN (ARNsi; a se vedea de mai jos) par a fi mai promițătoare [Paddison, 2002]. S-a observat că celulele de mamifere mature, în comparație cu celulele embrionare recunosc aceste secvențe de ARN dublu catenar lung ca patogeni invadatori. Acestea declanşează o reacție complexă de apărare a gazdei care blochează în mod eficient toate sintezele proteinelor în celulă printr-o enzimă serin/treonin kinaza interferon inductibilă numită protein kinaza R (PKR). PKR fosforilează subunitatea α a factorului 2 de inițiere eukariotic (EIF-2), care inhibă la nivel global translația ARNm. ARN dublu catenar lung activează de asemenea sintetaza 2',5' oligoadenilată, care, la rândul său, activează RNaza L. RNaza L clivează fără discriminare ARNm. Moartea celulelor trebuie înțeleasă, ca rezultat al acestor procese.

Numeroase studii au sugerat că ARNsi (ARN dublu catenar cu o lungime în jur de 21-22 nucleotide) nu pune în acțiune acest răspuns de apărare al gazdei, şi, prin urmare ar putea să stopeze expresia în celulele somatice de mamifere dacă sunt modificate corespunzător, adică conțin grupările 3'-hidroxi şi 5'-fosfat [Zamore şi colab., 2000]. Universalitatea aceastei abordări şi tipurile de gene, care pot fi modificate, folosind această strategie în celulele de mamifere sunt în conformitate cu studiile intense din acest moment.

6.5. Identificarea poziționării situsurilor accesibile ribozimelor la nivelul ARN țintă

Ribozimele de tip cap de ciocan ce acționează pe molecule diferite pot să desfacă orice ARN, atâta timp cât aceasta conține oricare din tripletele clivabile. Prezența unor astfel de triplete nu este de obicei limitată, dar identificarea regiunilor accesibile ribozimelor din ARN-ul țintă este un aspect important pentru succesul inhibării expresiei genei. ARNs au structuri secundare extinse şi este de aşteptat ca aceste regiuni care sunt deschise pentru andocarea unei oligonucleotide antisens, cum ar fi oligodeoxinucleotidele sau ribozimele să fie limitate. Până de curând astfel de situsuri au fost identificate de cele mai multe ori prin trialuri sau erori. Cu toate acestea, au fost elaborate noi abordări teoretice şi experimentale pentru a facilita

detectarea situsurile ARN accesibile. O astfel de abordare este scanarea ARN-ul țintă marcat prin hibridizare pentru o bancă de oligonucleotide cu secvența cunoscută prin microarray [Sohail şi colab., 2000].

O altă abordare este cea a renaturării oligodeoxinucleotidelor randomizate la un transcript al ARN şi clivajul ulterior al acestui complex prin RNaza H. Situsurile de clivare pot fi apoi scanate pentru tripleți susceptibili pentru clivaj de către ribozime. Analiza transcripților nu este în întregime satisfăcătoare pentru că structura secundară a ARNm în celule ar putea fi destul de diferită de cea a transcriptului. În plus, o parte din ARNm ar putea fi acoperit de proteine prevenind renaturarea oligonucleotidelor. Astfel, extinderea unor astfel de analize pentru ARNm nativ este lucrul cel mai de dorit, chiar dacă experimental este foarte provocator din cauza stabilității scăzute a produşilor de clivaj. Într-adevăr, analiza la murine a ADN metiltransferazei ARNm în extractul celular a fost realizată cu succes cu ajutorul oligonucleotidelor şi RNaza H [Scherr şi colab., 2000]. Siturile, astfel, selectate au fost eficiente în mod egal pentru inhibarea prin oligodeoxinucleotide şi ribozime.

Metode computaționale au fost, de asemenea puse la punct pentru a identifica astfel de situsuri [Patzel şi colab., 1999]. O comparație directă a demonstrat că situsurile identificate prin metode computaționale şi metode cu RNaza H au fost în concordanță. S-a constatat, că ribozimele cu brațe randomizate de legare a substratului au fost folosite pentru clivarea transcripților de ribozime în agrafă de păr [Putlitz şi colab., 1999].

6.6. Distribuirea exogenă a ribozimelor

Distribuția exogenă a ribozimelor depăşeşte problema alegerii vectorului, dar se confruntă cu probleme de degradare nucleazică a ribozimelor din ser şi asimilare celulară eficientă. Problema degradării ribozimelor distribuite exogen de nucleazele din ser a fost în esență soluționată prin modificări chimice aşa cum s-a discutat mai sus. În general asimilarea celulară în culturi celulare este realizată prin utilizarea de lipide cationice ca purtători, când încărcarea pozitivă este la exteriorul lipidelor, pentru interacțiunea electrostatică cu sarcina negativă a oligonucleotidelor.

Acum sunt disponibile diverse compoziții de astfel de lipide, unele mai potrivite pentru anumite linii celulare decât altele. Probabil că în viitor asocierea ribozimelor cu peptide cu proprietăți de transport cunoscute ar putea atenua această situație. De asemenea, o astfel de strategie ar putea deschide calea pentru distribuirea ribozimelor legată de tipul celular corespunzător. Cu toate acestea, există tipuri de celule în cultură, care preiau ribozimele destul de uşor, fără astfel de ajutoare, atât timp cât acestea sunt modificate chimic [Mariani şi colab., 2000]. Se presupune că astfel de celule, de exemplu celule ovariene de hamster chinezesc au o membrană foarte activă care facilitează transportul oligonucleotidelor.

Foarte interesant, ribozimele stablizate chimic sunt preluate de țesut după aplicare locală pe modele animale, fără purtători [Salmi şi colab., 2000]. Acest accept de aplicare *in vivo* a oligodeoxinucleotidelor antisens este, de asemenea, realizată fără purtători [Crooke, 2000]. Astfel, asimilarea oligonucleotidelor diferă în culturi celulare şi animale, şi înțelegerea acestor procese este încă nesatisfăcătoare.

Țintele pentru ribozomii modificați chimic în culturi celulare au fost c-myb, N-ras, luciferaza, receptorul factorului de creştere al endoteliului vascular, mai multe gene de rezistență la medicamente şi repetiția 5'terminală a virusului hepatitei C. Modele de studii *in vivo* cu ribozime sintetice au fost realizate pentru inhibarea expresiei amelogeninei, protein kinazei C, ARNm stromelizinei şi a receptorilor dopaminergici D2.

În continuare vor fi detaliate numai experimentele pe culturi celulare. Surprinzător gradul de inhibiție nu variază foarte mult în aceste studii între – 51 - 77% inhibiție (tabelul 6.1). Cu toate acestea, rezultatele sunt dificil de comparat, cu diferențele existente între liniile celulare, țintele ARNm, concentrațiile de ribozime, tipurile de modificări chimice şi purtătorii, şi, adesea, fără nici un screening pentru renaturarea ribozimelor bune sau situsul de clivare. Factorii care afectează eficiența inhibării ribozimelor includ, de asemenea, durata de viață a proteinelor şi ARNm. Evident, cu cât durata de viață a proteinelor este mai mare cu atât mai dificilă va fi inducția inhibiției. Dimpotrivă, ARNs cu un timp de înjumătățire lung sunt considerați cele mai bune substraturi pentru ribozime [Jensen, 2000].

Interesant, majoritatea autorilor observă un anumit grad de inhibiție a expresiei proteinelor chiar de către ribozimele inactive. Cea mai simplă explicație invocată de majoritatea investigatorilor este o oprire a translației.

Un alt mecanism care explică inhibiția ar putea fi clivajul ARN-ului țintă de o RNază dublu-catenară care a fost identificată în celule umane [Yuen, 2001], sau chiar un mecanism ARNi.

Tabelul 6.1. Medicamente antisens comerciale

Ținta	**Indicația**	**Compania**	**Produsul**	**Faza**
CMV	Retinite CMV	ISIS	Vitravene	Medicament
PKC-α	Cancer pulmonar fără celule mici	ISIS/Lilly	Affinitac	III
C-RAF	cancer ovarian	ISIS	ISIS 5132	II
H-ras	Cancer pancreatic	ISIS	ISIS 2503	II
ICAM-1	Boală Crohn	ISIS	ISIS2302/Alicaforsen	III
ICAM-1	Psoriazis	ISIS	ISIS2302/Alicaforsen	II
ICAM-1	Colite ulcerative	ISIS	ISIS2302/Alicaforsen	II
HCV	Hepatită C	ISIS	ISIS 14803	II
Factorul α de necroză tumorală	Boală Crohn, psoriazis	ISIS	ISIS 104838	II
c-myc	Cancer, restenozare	AVI-Biopharm	Resten-NG	III
Bcl	Cancer	Genta/Aventis	Genasense	III
HIV	SIDA	Enzo Biochem	HGTV43	II
Adenozina A1	Boli respiratorii	EpiGenesis	EPI2010	II
Protein kinaza	Cancer	Hybridon	Gem 231	II
Ribonucleotid reductaza	Cancer	Lorus Therapeutics	GTI2040	II
Factorul de creştere β2 tansformant	Cancer	Pharma antisens	AP 12009	I / II

Receptorul 1 al factorului de creştere vascular	Cancer	Ribozyme Pharmaceuticals	Angiozyme	II
HCV	hepatită C	Ribozyme Pharmaceuticals	Heptazyme	I
HER2	Cancer	Ribozyme Pharmaceuticals	Herzyme	I

6.7. Aplicațiile oligonucleotidelor în inhibarea expresiei genelor

Literatura de specialitate care descrie aplicațiile oligonucleotidelor pentru inhibarea expresiei genelor este destul de cuprinzătoare. Tabelul 6.1 rezumă în acest sens cele mai sugestive exemple obținute din trialuri de fază clinică chiar dacă ele sunt încă incomplete. Nu este surprinzător, ca aceste investigații să fie aproape exclusiv efectuate de către companii având în vedere cheltuielile enorme implicate. Singura excepție notabilă este studiul laboratorului Gewirtz pe leucemie mieloidă cronică pentru tratament *ex vivo* [Luger şi colab, 2002]. Nu toate exemplele menționate pot fi discutate aici, astfel încât uneori sunt suficiente puține comentarii. Toate oligonucleotidele utilizate în studiile clinice au în comun un aspect al naturii lor chimice, şi anume toate sunt oligonucleotide conținând fosforotioați. Primul medicament antisens aprobat a fost realizat de ISIS, Fomivirsen sau VitraveneR, un nume comercial de la Novartis. Cu toate acestea, numărul de pacienți cu retinită cauzată de citomegalovirus (CMV) a crescut mai puțin din cauza tratamentului de succes al SIDA, cel puțin în emisfera vestică. Moleculele de adeziune intracelulare (ICAM) -1 de la aceeaşi companie folosite ca medicație pentru boala Crohn, nu a fost încă aprobate, dar se fac cercetări în continuare pentru ca medicamentul sub numele comercial AlicaforsenTM să fie pe piață. Dezvoltarea oligonucleotidelor Genta anti BCL2 GenasenseTM pentru tratamentul melanomului malign coroborată cu chimioterapia, este destul de avansată [Jensen şi colab., 2000]. Genasense este implicată în trialuri clinice de fază a III dezvoltate împreună cu Aventis. AffinitacTM este un potent inhibitor al protein kinazei C în cancerul pulmonar fără celule mici, care arată o rată aproape dublă de supraviețuire (16 luni în loc de 8), în

combinație cu carboplatin/taxol. Obiectivul principal este de a obține un profil sinergistic bun în combinație cu agenți chemoterapeutici (aşa cum este obiectivul cu Genasense), cu Taxol în acest caz. Affinitac este, de asemenea, testat într-un trial cu un singur agent (faza II) împotriva limfomului nonHodgkin. În acest ultim caz este în curs o colaborare împreună cu Eli Lilly [Yuen şi colab., 2001].

6.8. Concluzii

Acizi nucleici, în special oligonucleotidele antisens, sunt acum considerate ca fiind medicamente candidate. Compusul, Vitravene, este în prezent pe piață şi mai mulți compuşi promițători sunt în prezent în studii clinice de fază III. Succesul lor va defini potențialul impact al oligonucleotidelor antisens. În plus, utilizarea ribozimelor pare să aibă rezultate pozitive în aplicații ale medicamentelor, cu toate că unele obstacole încă mai trebuie să fie depăşite. Cel mai recent concept, ARNi, este în fază incipientă dar are un foarte mare potențial, deoarece presupune un concept natural. Cele mai serioase limitări sunt determinate de asimilarea celulară săracă, şi distribuția încă ineficientă în organe. Probabil că rezolvarea acestor impedimente va decide viitorul oligonucleotidelor ca medicamente.

PARTEA III: METODE ANALITICE IMPLICATE ÎN PRODUCEREA ŞI UTILIZAREA MEDICAMENTELOR

CAPITOLUL 7

TENDINȚE RECENTE ÎN ENANTIOSEPARAREA MEDICAMENTELOR CHIRALE

7.1. Introducere

Domeniul enantioseparării atrage atenția din două perspective: (1) prepararea compuşilor chirali biologic activi puri din punct de vedere enantiomeric şi (2) analize enantioselective ale medicamentelor chirale în procesul de producție, formulare, depozitare şi folosire al acestora.

În cadrul proceselor de producție, tehnicile de enantioseparare cromatografică au concurenți puternici precum cristalizarea diastereomerică, separarea kinetică, rezervele chirale, sinteza catalitică asimetrică, tehnologii bazate pe membrane etc. Totuşi în domeniul analizei nu există alternative viabile pentru tehnicile bazate pe metode separative.

Tehnicile chiroptice cum ar fi metodele tradiționale polarimetrice, cele bazate pe dispersie (rotația planului luminii polarizate) sau spectrometrice, precum şi spectroscopia de rezonanță magnetică nucleară (RMN), nu pot concura în termeni de acurațe, sensibilitate, simplitate, timp de analiză, costuri, etc. cu tehnicile pe bază de separare cum ar fi cromatografia gazoasă (GC), cromatografia în lichid de înaltă performanță (HPLC), cromatografia supercritică în fluid (SFC), electroforeza capilară (CE) şi electrocromatografia capilară (CEC).

Scopul acestui capitol este să discute tendințele actuale şi să prezinte perspectiva evoluției domeniului enantioseparării.

7.1.1. Stereochimia în acțiunea medicamentelor

Substanțele chirale şi enantiomerii

Medicamentele chirale au două forme structurale similare care se pot comporta foarte diferit în sisteme biologice datorită formelor lor diferite în spațiul tri-dimensional. Aceste două forme posibile sunt denumite *enantiomeri* iar cei doi enantiomeri ai unui medicament chiral ar trebui să fie considerate două medicamente diferite.

Chiralitatea este definită ca şi proprietatea geometrică a unui obiect rigid (precum o moleculă sau un medicament) de a nu putea fi superpozabil cu imaginea sa în oglindă. Moleculele ce pot fi superpozabile cu imaginile lor în oglindă sunt achirale (non-chirale). Chiralitatea este o proprietate a materiei identificată în majoritatea sistemelor biologice pornind de la elementele de bază ale vieții aminoacizii, carbohidrații şi lipidele. Chiralitatea este adesea ilustrată prin ideea de nesuperpozabilitate a mâinilor dreaptă şi stângă: mâna stângă şi mâna dreaptă sunt reciproc imaginile în oglindă ale celeilalte dar nu sunt superpozabile. Cele două imagini în oglindă ale unei molecule chirale sunt denumite *enantiomeri*. Ca şi mâinile, enantiomerii sunt perechi. Ambele molecule ale unei perechi de enantiomeri au aceiaşi compoziție chimică şi pot fi schițați identic în două dimensiuni, dar în medii chirale cum ar fi receptorii şi enzimele din organism acestea pot avea un comportament diferit. Un *amestec racemic* reprezintă un amestec de cantități egale din ambii enantiomeri ai unui medicament chiral. Frecvent, chiralitatea la medicamente îşi are sursa într-un atom de carbon la care sunt ataşate patru grupări diferite însă pot exista şi alte surse pentru chiralitate. Sub termenii de *stereoizomeri* sau *izomeri unici* sunt uneori denumiți enantiomerii singuri/unici. Aceşti termeni se pot aplica şi în cazul medicamentelor sau moleculelor achirale şi nu indică faptul că în acest caz este prezent un enantiomer. De exemplu, molecule izomere au aceeaşi formulă moleculară stoichiometrică dar pot avea structuri foarte diferite.

Aşadar, termenii *enantiomer*, *izomer unic* şi / sau *stereoizomer unic* se pot folosi unul în locul celuilalt.

Cei 2 enantiomeri ai unui medicament chiral se pot identifica cel mai bine pe baza configurației absolute a acestora sau pe baza rotației optice. Alte denumiri cum ar fi D sau L sunt utile în cazul zaharurilor sau aminoacizilor dar ele sunt specifice acestor molecule şi nu sunt general aplicabile altor compuşi. Termenii *dextro* sau *levo* sunt considerați învechiți şi ar trebui evitați. În locul lor ar trebui folosit sistemul *R/S* pentru configurația absolută (*R* = *rectus* = dreapta, în sensul acelor de ceasornic *S*=*sinister*= stânga, în sens invers acelor de ceasornic, din lb. latină) şi sistemul +/– pentru rotația optică, termeni ce țin cont de reguli precise bazate pe numărul atomic şi masă pentru a determina dacă centrul unei particule chirale are o configurație *R* sau *S*.

Un medicament chiral poate avea mai mult decât un singur centru chiral, iar în astfel de cazuri este necesară determinarea configurației absolute pentru fiecare centru chiral. Rotația optică este folosită deseori pentru că este mai uşor de determinat experimental decât configurația absolută, însă ea nu oferă informații despre configurația absolută a unui enantiomer. Pentru o pereche dată de enantiomeri, unui enantiomer îi poate fi alocată notația (+) iar celuilalt (–) pe baza direcției în care ei rotesc planul luminii polarizate. Rotațiile optice au fost descrise ca fiind *dextrorotatorii* (+) sau *levorotatorii* (–). Amestecurile racemice sunt notate (*R,S*) sau (±).

7.1.2 Medicamentele chirale în sistemele biologice

Enantiomerii aceluiaşi medicament chiral au proprietăți fizice şi chimice identice în medii achirale, însă în medii chirale ele prezintă comportamente chimice şi farmacologice diferite (fig.7.1). Deoarece sistemele vii sunt ele însele medii chirale, fiecare enantiomer ai unui medicament chiral se comportă foarte diferit *in vivo*. De aceea, pentru un medicament chiral dat, cei doi enantiomeri se consideră a fi două medicamente diferite, dacă nu este demonstrat contrariul.

În cazul ilustrat mai sus, unul din enantiomeri este activ biologic, iar celălalt enantiomer nu este. Domeniile A,B şi C ale medicamentului trebuie să interacționeze cu regiunile corespunzătoare ale situsului de legare *a,b* şi *c* pentru ca medicamentul să poată avea efectul farmacologic.

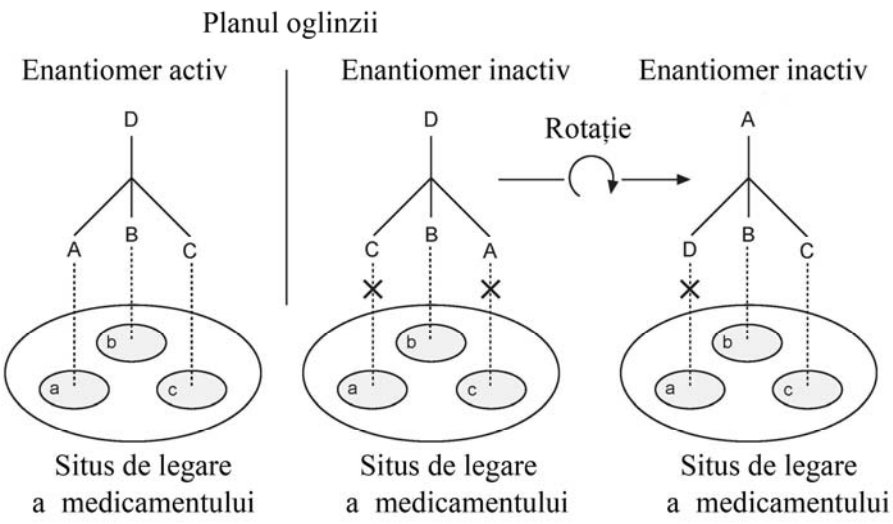


Fig.7.1 Diferența dintre doi enantiomeri ai unui medicament prin intermediul unei interacțiuni ipotetice între un medicament chiral şi situs-ul său de legare chiral.

Enantiomerul activ are o structură 3D care permite domeniului A al medicamentului să interacționeze cu situsul de legare *a* , B să interacționeze cu *b* şi C să interacționeze cu *c*. În contrast, enantiomerul inactiv nu poate fi aliniat astfel încât să lege cele trei situsuri simultan, deşi posedă aceleaşi grupări A, B, C şi D. Aceste diferențe structurale 3D nu permite enantiomerului inactiv să aibă efect biologic la nivelul acestui situs. În unele cazuri, porțiunea unei molecule care conține centrul / centrii chirali poate fi situată într-o regiune care nu joacă un rol în capacitatea moleculei de a interacționa cu ținta acesteia. În aceste cazuri enantiomerii pot avea proprietăți farmacologice foarte asemănătoare sau chiar similare la nivelul situsului de legare. Chiar şi în aceste cazuri, enantiomerii au un profil metabolic diferit, afinitate diferită față de alți receptori, transportori sau enzime (Dingermann şi colab.,2004).

7.1.3. Importanța chiralității pentru medicamente

Aproximativ 50% din medicamentele de pe piață sunt chirale, iar dintre acestea aproximativ 50% sunt mixturi de enantiomeri. Clinicianul poate avea la dispoziție în acelaşi timp un medicament sub formă de amestec de enantiomeri sau sub forma unui singur-enantiomer, fiind astfel foarte importantă distincția dintre cele două deoarece

între acestea pot exista diferențe de dozaj, eficacitate, efecte secundare şi chiar de indicații. Decizia utilizării formei de un „singur-enantiomer” – IC sau a amestecului de enantiomeri pentru un anumit medicament ar trebui luată pe baza datelor din trialuri clinice şi a experienței clinice.

Folosirea medicamentelor „enantiomerice unice” poate favoriza un profil farmacologic mai simplu şi mai selectiv, indici terapeutici îmbunătățiți, farmacodinamică mai simplă şi scăderea interacțiunilor medicamentoase. În trialuri clinice (S) albuterolul, agonist al receptorilor β_2 adrenergici utilizat în tratamentului astmului şi (S) omeprazolul, inhibitor al pompei de protoni utilizat în tratamentul refluxului gastroesofagian, s-au dovedit a fi superioare față de formele de prezentare racemice. În alte cazuri însă la efectele terapeutice contribuie ambii enantiomeri, iar utilizarea unor „enantiomeri singuri” poate avea efecte mai reduse sau poate chiar să fie dăunătoare față de forma racemică, aşa cum se întâmplă enantiomerului (-) al sotalolului, cu activitate β blocantă şi antiaritmică, în timp ce enantiomerul (+) al acestuia are proprietăți antiaritmice însă nu are efecte antagoniste β adrenergice.

7.2. Situația actuală a dezvoltării şi utilizării medicamentelor chirale

Necesitățile industriei farmaceutice şi ingeniozitatea chimiştilor au determinat o creştere continuă a vânzărilor compuşilor cu structură specifică unui „enantiomer-singur” [Stinson , 2001].

Conform unor prognoze de actualitate, cererea de materiale chirale brute, ingrediente intermediare şi active, va creşte cu 9,4% în anii următori. Această creştere spectaculoasă este determinată de industria farmaceutică. Astfel, de la o cifră de vânzare aşteptată de 15,1 miliarde de dolari, producătorii de medicamente vor fi responsabili pentru 11,5 miliarde de dolari (76%). Ce face domeniul compuşilor chirali un domeniu atât de atractiv pentru dezvoltatorii şi producătorii de medicamente? Unele aspecte majore favorizează dezvoltarea afacerilor cu compuşi chirali, în mod special în cadrul industriei farmaceutice.

Primul şi cel mai important aspect care reprezintă baza tuturor activităţilor din acest domeniu este reprezentat de diferenţa semnificativă ce se constată între proprietăţile farmacologice şi cele toxicologice ale enantiomerilor compuşilor chirali biologic activi. Se cunosc multe exemple şi în numeroase cărţi, capitole de cărţi şi overview-uri s-a analizat acest subiect [Mehvar , Brocks , 2001; Vakily şi colab., 2002].

Al doilea aspect important este reprezentat de un mecanism de protecţie care permite companiilor farmaceutice să îşi prelungească drepturile de proprietate asupra medicamentelor chirale, pe care anterior le-au comercializat sub forma racemică şi vor fi dezvoltate şi patentate ca şi entitate a unui „singur-enantiomer”. Exemple recente de acest fel includ compusul „enantiomer-singur” al inhibitorului înalt potent al secreţiei acide gastrice omeprazol introdus pe piaţa europeană în 2001 de AstraZeneca, S-enantiomerul medicamentului antidepresiv chiral citalopram al Forest Laboratories, R-enantiomerul medicamentului chiral antialergic cetirizina introdus în 2001 de către UCB Pharm, şi S-ibuprofen folosit în Austria şi Elveţia de câţiva ani şi introdus recent şi pe piaţa din Germania.

Al treilea aspect care favorizează domeniul compuşilor chirali este cel al reglementărilor. De exemplu, în actul Agenţiei Europene pentru Evaluarea Produselor Medicinale (EMA) activ de la 1 Ianuarie 1998, se menţionează: „dacă un nou amestec racemic pare promiţător, ambii enantiomeri ar trebui studiaţi separat cât mai curând posibil pentru a se evalua relevanţa stereoizomerismului asupra efectului şi evoluţiei acestuia „*in vivo*”. Astfel de reglementări facilitează intrarea pe piaţă a medicamentelor chirale nou dezvoltate ca şi a unui „singur-enantiomer”. Exemplele includ medicamentul cu efect de scădere a nivelului colesterolului atorvastatina (Lipitor) aprobat în 1996 şi cu vânzări de 4 miliarde de dolari americani , fiind unul din cele mai bine vândute medicamente în Statele Unite în 1999. O creştere puternică a vânzărilor pe o perioadă scurtă a fost observată şi pentru alte medicamente chirale de tip „enantiomer singur” precum amprenavirul, care a fost aprobat în 1999 de către FDA (Administraţia Alimentelor şi Medicamentelor a SUA) pentru tratamentul infecţiilor HIV şi pentru primul reprezentant al unei clase noi de antibiotice,

Linezolid, care a fost aprobat de FDA în Aprilie 2000. Această listă include şi medicamentul chiral cu efect asupra sistemului respirator montelucast, antireumatoidul (inițial cu efect gastrointestinal) infliximab, agentul tamsulosin cu efect pe hiperplazia prostatei şi medicamentul oftalmic latanaprost pentru tratamentul glaucomului (Dingermann şi colab.,2004).

Diferite companii folosesc în mod curent câteva strategii pentru a intra pe piața de afaceri cu compuşi chirali. Unele companii re-lansează propriile medicamente sau medicamente deja cunoscute ca fiind chirale de la alte companii, ca şi noi produse a unui „singur enantiomer". Astfel, de exemplu, o listă de produse internaționale patentate de compania Sepracor în 1999 include enantiomerii următoarelor medicamente: (S)- şi (R)-terodilina, (-)- şi (+)-pantoprazol, (-)- şi (+)-zileuton, (-)-şi (+)-ketoconazol, (+)- şi (-)-doxazosin, (+)- şi (-)-cetirizina, (+)- şi (-)-sibutramina, (-)- şi (+)-pirbuterol, (R)- şi (S)-ondasetron, (+)- şi (-)-cisaprid, şi (+)- şi (-)-zopiclon. Alte companii dezvoltă metaboliți chirali farmacologic activi ai medicamentelor chirale sau prochirale ca şi noi medicamente sub formă de „enaniomer-singur". Exemplele includ (R)- şi (S)-norfluoxetina produsă de Eli Lilly şi metabolitul activ al zopiclon-ului. Astfel, aşa cum se poate vedea din exemplele menționate mai sus, chiralitatea este un domeniu important al industriei farmaceutice. Ca şi în practica clinică, chiralitatea are în vedere stabilirea unor corelații mai bune între concentrațiile medicamentului şi efectele terapeutice, evitarea efectelor adverse ale medicamentelor ținând cont mai bine de efectele vârstei, genotipurilor, dietei, interacțiunilor medicamentoase, etc. asupra eficacității terapiei cu medicamente chirale.

Aşa cum am menționat mai sus, tehnicile de separare nu sunt singurele metode disponibile pentru producerea medicamentelor chirale în forme pure din punct de vedere enantiomeric. Alternative valoroase sunt reprezentate de strategii bazate pe pool-ul chiral, sinteza catalitică asimetrică etc. Totuşi, în cazul oricărui medicament chiral, sunt necesare tehnici de enantioseparare analitică pentru a avea control asupra purității enantiomerice a etapei de producție (tehnologie de producție) şi de stocare, precum şi pentru a se urmări efectele enantioselective din cursul acțiunii şi biotransformării acestuia.

7.3. Rolul tehnologiilor de separare în producerea, cercetarea şi utilizarea medicamentelor chirale

Revoluția tehnologiei chirale s-a bazat pe capacitatea măsurării purității enantiomerice *[Stinson 2002].*

Impactul tehnicilor de enantioseparare instrumentale asupra producerii şi utilizării medicamentelor chirale este imens. Pentru a evalua rolul efectelor enantiospecifice din cadrul acțiunii medicamentoase chirale, enantiomerii trebuie preparați în cantități cel puțin suficiente pentru studii elementare farmacologice şi toxicologice. Împreună cu metoda clasică a cristalizării diasteromerice, tehnicile de separare cromatografică au avut o contribuție importantă în producția medicamentelor chirale enantiomeric pure. De fapt, la începuturile dezvoltării acestei ramuri, s-a aplicat metoda cromatografiei pe coloană lichidă de joasă presiune în cea mai simplă formă a acesteia pentru enantiosepararea acelor medicamente chirale care erau imposibil de sintetizat prin tehnicile existente la acel moment datorită lipsei grupărilor funcționale adecvate sau a proprietăților structurale necesare. La începutul anilor '70, tehnicile cromatografice au făcut posibilă obținerea enantiomerilor medicamentelor chirale precum metfenithoina, metiprilona, glutetimid, hexobarbital, chlortalidona, oxazepam, biglumid, etc. Enantiomerii talidomidei, care a fost sintetizată inițial pe baza unui compus intermediar foarte scump, au devenit disponibili uşor pentru studiile farmacologice pentru prima dată prin intermediul enantioseparării cromatografice directe.

La începutul anilor '80 s-a comercializat prima coloană pentru enantiosepararea pe scară-analitică folosind HPLC. Acest fapt, urmat de extensia pe piață a coloanelor HPLC chirale au fost evenimente cheie în promovarea pe scară largă a tehnicilor de enantioseparare în cadrul analizelor farmaceutice şi analitice. GC chirală, deşi cu un istoric mai îndelungat decât HPLC nu are un rol important în dezvoltarea medicamentelor chirale, iar utilizarea acestuia este limitată datorită caracterului polar şi a volatilității scăzute a majorității medicamentelor. Merită menționate câteva studii excelente ce fac excepție de la situația mai sus precizată [Schurig şi colab., 1995; Juza şi colab., 1998]. Aşa cum se arată în aceste studii, GC chirală poate asigura un

potențial însemnat nu numai pentru separarea la scară analitică, ci şi pentru separarea la scară preparativă a unor gaze chirale.

SFC chirală posedă un potențial cert pentru enantiosepararea la scară analitică [Phinney, 2002.] şi, în mod special, pentru enantiosepararea la scară preparativă [Terfloth, 2001]. Totuşi, această tehnică nu şi-a câştigat locul pe care aparent îl merită în acest domeniu. Unul din motivele pentru care lucrurile stau în acest fel pare a fi lipsa de sprijin din partea companiilor de instrumente precum şi activitatea de cercetare relativ redusă susținută de către laboratoarele academice din domeniul enantioseparării prin SFC.

Prima publicație ce a descris enantiosepararea prin CE a apărut în acelaşi an (1985) cu publicația ce descria SFC chirală. După 1992, CE chiral se bucură în continuare de o dezvoltare rapidă şi de o utilizare în creştere în mediul industrial. Aplicațiile precoce ale altei tehnici de electromigrare, CEC, în domeniul enantioseparării a apărut în 1992 – 1993. În ciuda unor realizări impresionante, această tehnică are încă un loc important în domeniul enantioseparării. Cerințele viitoare vor arăta care tehnici vor supraviețui mai bine din paleta largă de tehnici disponibile în prezent pentru enantiosepararea analitică şi de producție.

7.4. Prepararea medicamentelor enantiomeric pure

Există trei surse principale de enantiomeri puri: amestecuri racemice, marea diversitate de molecule chirale (carbohidrați, terpene, alcaloizi, peptide) ce se găsesc în mod natural ca şi enantiomeri puri şi compuşii prochirali. Principalele metode de obținere a enantiomerilor puri pornind de la sursele amintite sunt prezentate în figura 7.2. Metodologia prezentată în acest subcapitol porneşte de la utilizarea amestecurilor racemice ca şi sursă pentru enantiomerii puri. Modul de transformare a amestecurilor racemice în enantiomeri puri se bazează pe separarea kinetică sau cristalizare. Fiecare din aceste metode poate fi efectuată în mai multe moduri, care sunt discutate pe scurt mai jos.

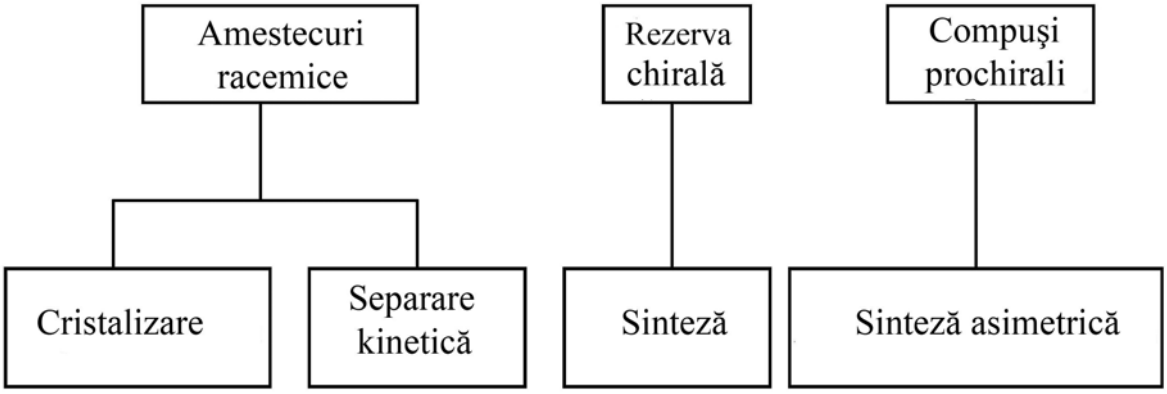


Fig. 7.2 Principalele metode pentru obținerea enantiomerilor puri.

7.4.1. Separarea amestecurilor racemice

Separarea amestecurilor racemice este cea mai veche tehnică şi rămâne în continuare principala metodă de sinteză industrială a moleculelor biologic active enantiomeric pure. Compuşii chirali puri sau îmbogățiți enantiomeric din amestecurile racemice pot fi obținuți prin cristalizare preferențială, separarea kinetică sau separarea prin membrană.

Cristalizarea preferențială este fezabilă din punct de vedere tehnic numai pentru amestecurile racemice aşa-numite conglomerate. Mai puțin de 20% din toate amestecurile racemice sunt conglomerate. Această tehnică este folosită la scară industrială în producția cloramfenicolului şi α-meti-L-dopa. În câteva cazuri este posibilă şi cristalizarea directă a sărurilor cu acizi sau baze non-chirale. De exemplu, separarea DL-lizinei poate fi realizată prin cristalizarea preferențială a sării acesteia *p*-aminobenzen-sulfonate. Naproxen poate fi separat în acelaşi fel prin intermediul sării acestuia cu etilamina.

Derivarea unui amestec racemic prin reacția cu un compus optic pur produce un amestec de diasteromeri cu proprietăți fizice diferite. Astfel de mixturi pot fi separate prin metode fizice cum ar fi cristalizarea. Adesea prin separare clasică ne referim la această metodă. Deşi nu vom analiza această tehnică menționăm că ea poate fi foarte utilă pentru obținerea medicamentelor chirale enantiomeric pure pentru

studii experimentale şi clinice precoce. În plus, această tehnică este încă folosită pentru producerea medicamentelor chirale enantiomeric pure cum ar fi amoxicilina, captopril, *cis*-diltiazem, naproxen, cefalexin, cefadroxil, timolol, dextrometorfan, etambutol, etc. În figura 7.3 este exemplificată metoda industrială de obținere a (*S,S*)-etambutolului.

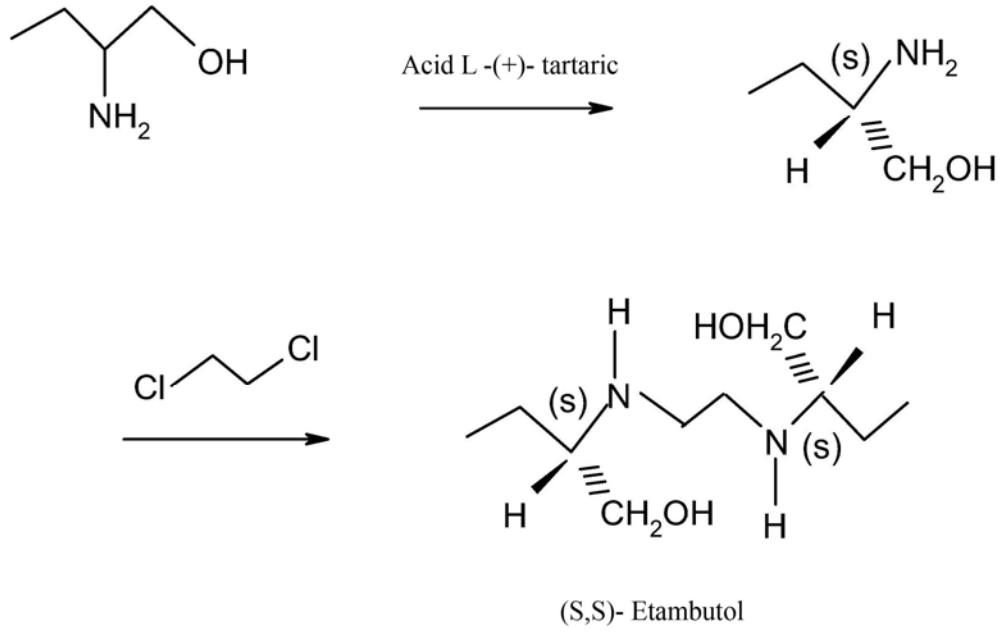


Fig. 7.3 Etapele industriale de preparare a (S,S) -etambutolului prin cristalizare diastereomerică (după Sheldon , 1993).

Cristalizarea diastereomerică are dezavantajul valabil pentru toate procedeele de enantioseparare. Concret, produsul enantiomerului dorit nu depăşeşte niciodată 50%. Dacă enantiomerul nedorit nu poate fi separat sau nu se poate folosi în alte scopuri, 50% din produsul nedorit însoţeşte producția enantiomerului dorit. Aceasta poate constitui o problemă serioasă în cadrul fabricației pe scară largă a enantiomerilor, nu însă şi în cazul producției enantiomerilor în cantități de câteva grame sau kilograme. O altă problemă delicată a cristalizării diastereoizomerice constă în imposibilitatea raționalizării acestei tehnologii pe baza cunoştințelor actuale. Metodele de cristalizare trebuie să fie îmbunătățite prin trialuri şi studiul erorilor, pe baza intuiției şi experienței. În anumite cazuri trebuie luată în discuție problema tehnică a disponibilității unor agenți de separare chirali naturali în cantități mari.

Metoda de separare kinetică pentru obținerea de compuşi chirali enantiomeric puri devine din ce în ce mai importantă. Această metodă poate fi definită ca un proces prin care este transformat predominant unul dintre enantiomerii unui amestec racemic în comparație cu celălalt. Metoda de separare kinetică poate fi aplicată cu ajutorul catalizatorilor chimici sau biologici. Prin acest proces se poate obține până la maxim 50% produs enantiomeric, procent similar cu cel al cristalizării diastereoizomerice. Astfel, devine foarte necesară o tehnică de enantioseparare la scară analitică sau industrială, cu racemizarea enantiomerului nedorit.

Dintre avantajele enzimelor ca şi catalizatori se pot aminti eficiența ridicată a acestora, selectivitatea de substrat, selectivitatea chimică, selectivitatea de regiune şi stereoselectivitatea. În plus, enzimele funcționează în medii uşoare şi nu necesită solvenți organici. În procesul de producție a medicamentelor pure din punct de vedere enantiomeric, pot fi folosiți reprezentanții tuturor claselor principale de enzime, respectiv oxidoreductazele, transferazele, hidrolazele, enzime litice, izomerazele şi ligazele. S-au pus la punct tehnici de fabricare viabile comercial a (S)-naproxen, cis-diltiazem şi a altor câteva medicamente.

Tehnologiile de separare cu membrană sunt şi ele considerate promițătoare în domeniul producției de compuşi chirali enantiomeric puri. De fapt există două metode pentru utilizarea membranelor în acest scop şi anume transportul enantioselectiv [Brice , Pirkle , 1996 .] şi bioreactorii membranari [Bormarius şi colab.,1992.]. Prima dintre acestea nu a fost încă aplicată pe scară largă pentru fabricarea medicamentelor chirale enantiomeric pure sau intermediarilor acestora, în timp ce bioreactorii membranari sunt bine cunoscuți pentru obținerea L-α-amino-acizilor.

7.4.2. Rezerva chirală

Compuşii enantiomeric puri disponibili în natură sau prin producția pe scară largă prin procese de fermentare reprezintă materii prime valoroase pentru producția medicamentelor enantiomeric pure. Multe dintre aceste materiale, cum ar fi carbohidrații, amino-acizii, terpene, alcaloizi etc., au prețuri comparabile cu a

produselor petrochimice şi îşi găsesc o multitudine de aplicații industriale ca şi substrat chiral, auxiliari chirali şi surse de liganzi chirali pentru cataliză asimetrică.

Carbohidrații neprelucrați, ca şi produşii rezultați în urma prelucrării lor (reacții simple de oxidare sau reducere) sunt larg utilizați ca şi intermediari chirali în industria farmaceutică şi chimică uşoară. Dintre hidroxi-acizi, atât D- cât şi L- acidul lactic reprezintă materii prime utile pentru obținerea ierbicidelor enantiomeric pure, respectiv (R)-fluazifop-butil, (R)-mecoprop şi (R)-flampropisopropil. Acidul (R,R) tartaric, solvent larg utilizat, reprezintă şi materii prime chirale de interes. De exemplu, în cadrul companiei farmaceutice Zambon este utilizat în sinteza (S)-naproxen –ului. Şi acidul (S,S) tartaric este un produs natural, destul de rar. Totuşi, acesta poate fi obținut sintetic şi este folosit la producerea fosfomicinei. În privința altor hidroxi-acizi, acidul β-hidroxibutiric prezintă un interes deosebit pentru industria farmaceutică. Acidul (R)-β-hidroxibutiric poate fi utilizat pentru sinteza intermediarilor carbapenemului şi a captoprilului, în timp ce acidul (S)-β-hidroxibutiric este util în sinteza catenei laterale a vitaminei E.

Aminoacizii naturali, uşor disponibili în cantități mari, reprezintă cea mai importantă clasă de compuşi pentru rezerva chirală. De exemplu, L-prolina provenită din fermentație, este materia primă cheie pentru o varietate de medicamente inhibitoare ale acetilcolin-esterazei (ACE) precum captopril, enalapril, lisinopril, etc.

Alți aminoacizi uşor disponibili, cum ar fi acidul L-glutamic, acidul L-aspartic şi L-treonina, s-au utilizat ca şi unități structurale pentru sinteza aztreonamului şi a antibioticelor carbapenemice precum thienamicina. Împreună cu compuşii mai sus amintiți, în strategia rezervei chirale, ca şi materie primă pot fi folosiți şi unii aminoacizi sintetici, fabricați la scară largă, terpene, alcaloizi etc.

7.4.3. Sinteza catalitică asimetrică

Sinteza catalitică asimetrică devine importantă pentru obținerea materialelor enantiomeric pure. Sinteza asimetrică se poate face prin cataliza biologică, aşa cum s-a menționat în paragraful 7.4.1. În cele ce urmează se vor discuta cataliza chimică,

cum este cataliza metalică heterogenă, complexe omogene şi acizii şi bazele chirale solubile.

S-au făcut studii mai vechi în acest domeniu al catalizei asimetrice heterogene având ca scop înțelegerea originii chiralității. Pentru aceasta s-au folosit ca substrat pentru cataliza metalică materiale solid chirale precum cuarțul, mătasea, celuloza etc. Procesul de sinteză al L-dopa elaborat de Knowles şi Sabacky la Monsanto în 1966–1968, a fost primul procedeu elaborat pentru producția la scară industrială a unui medicament farmaceutic enantiomeric pur prin cataliză asimetrică. În 1971, Kagan şi Dang au descris un catalizator de hidrogenare asimetric ce conține o difosfină chirală, derivată din acidul L-tartaric. În anii '80, Noyori şi colaboratorii a introdus aşa-numita serie BINAP a liganzilor chirali derivați din gruparea binaftil chirală axială [Noyori , 2002].

Acum, hidrogenarea asimetrică catalitică pe baza metodelor mai sus amintite şi cele înrudite cu acestea reprezintă una din cele mai comune moduri de fabricare a medicamentelor chirale enantiomeric pure. Ca exemple amintim (S)-naproxen, catena laterală a vitaminei E, alcaloizi izochinolin precum morfina, benzomorfani şi morfinani precum antitusivul dextrometorfan, antibiotice carbapenemice, (R)-1,2-propandiolul intermediar al levofloxacin-ului, carnitina, statinele, fosfomicina, intermediari ai antraciclinelor, denopamina, fluoxetin, duloxetin, orfenadrin, neobenodin, prostaglandinele, β-blocantele, medicamentul antihelmintic (şi anti-inflamator) levamisol, etc.

Metodele oxidative asimetrice, incluzând epoxidarea, hidroxilarea şi aminoxidarea reprezintă căi importante de obținere a produselor farmaceutice enantiomeric pure la scară comercială [Sharpless , 2002]. Epoxidarea de precizie mai mică este folosită pentru fabricarea (R)- şi (S)-glicidol–ului, intermediari importanți în sinteza β-blocantelor enantiomeric pure. Dihidroxilarea asimetrică este folosită în sinteza antagonistului canalelor de calciu *cis*-diltiazem.

Sulfoxidarea catalitică asimetrică poate căpăta importanță în viitor datorită unei creşteri a cererii pe piață pentru inhibitorii chirali ai secreției acide gastrice cu structură sulfoxidică, precum omeprazol, pantoprazol, rabeprazol, peprazol şi

lansoprazol. Primul medicament enantiomeric pur al acestei clase, (S)-omeprazol –ul (esomeprazol), există deja pe piață. Acest medicament se obține prin sulfoxidarea asimetrică catalitică, aşa cum este prezentată schematic în figura 7.4

În plus față de cele câteva tipuri de reacții menționate în acest subcapitol, pentru sinteza medicamentelor enantiomeric pure se pot aplica o mare varietate de transformări asimetrice catalitice, cum ar fi reacții de hidrogenare a legăturii C=N, hidroxililare, izomerizare, hidroformilare, ciclopropanare, adiție, hidrocianare, condensare etc.

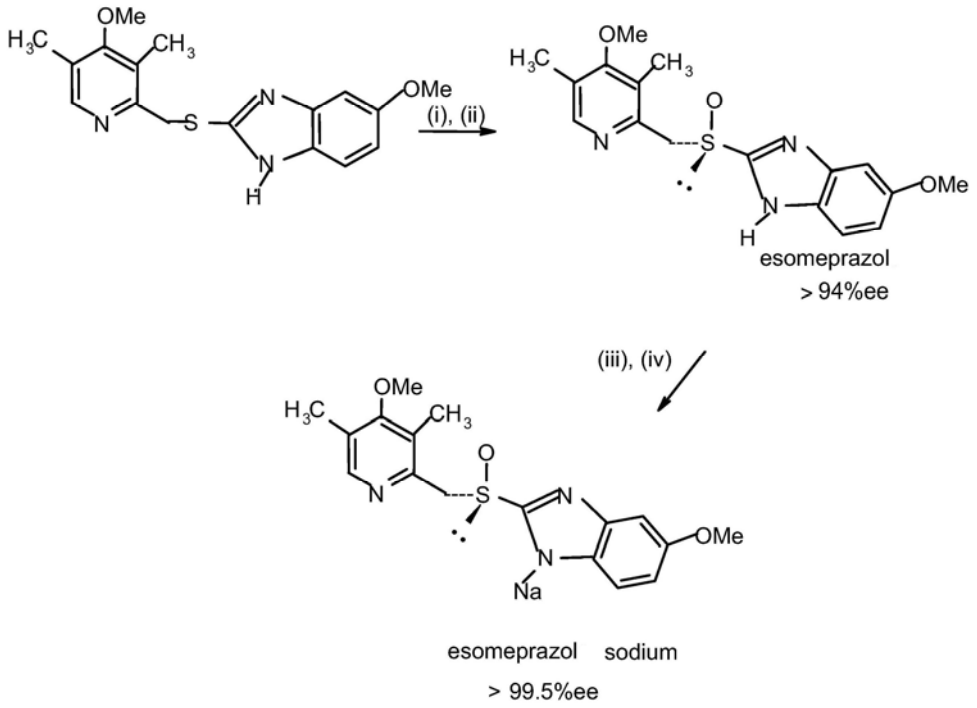


Fig. 7.4 Reprezentare schematică a obținerii (S)-omeprazol-ului la scară industrială (după Cotton şi colab.,2002)

7.4.4. Tehnici de cromatografie

Aşa cum am mai precizat, metoda cromatografiei pe coloană în cea mai simplă formă a acesteia, tehnica discontinuă, a avut o contribuție importantă la obținerea unor cantități relativ mici de produse farmaceutice chirale enantiomeric pure [Blaschke şi colab., 2000]. Totuşi, datorită capacității mici de producție, diluției mari a produselor obținute şi a consumului crescut de solvenți organici utilizați în producție, această metodă s-a arătat a fi ineficientă economic pentru producția pe

scară largă a medicamentelor enantiomeri. Dintre tehnicile cromatografice, cromatografia în straturi în mişcare simulată (SMB) este metoda principală pentru prepararea în cantităţi mici sau în producţia pe scară largă a medicamentelor enantiomeric pure. Această tehnică este discutată în detaliu în cele ce urmează. În plus, în secţiunea 7.4.4.2 sunt prezentate succint câteva aplicaţii noi ale GC-SMB cromatografiei în contra-curent şi enantioseparareа în cantităţi mici prin tehnici de electromigrare.

7.4.4.1. Cromatografia în straturi în mişcare simulată (SMB)

SMB este un proces cromatografic continuu care simulează o mişcare în contra-curent a fazei staţionare şi a fazei mobile. Funcţionarea continuă a sistemului este asigurată prin alimentarea solventului şi a amestecului componentei ce trebuie separată şi prin extracţia continuă a componentelor separate (fig. 7.5). Alimentarea cu solvent şi mixturii de enantiomeri precum şi extracţia fracţiilor separate este asigurată de patru pompe independente. O a cincea pompă este folosită pentru reciclarea în interiorul sistemului a circuitului de lichid principal. Această montare ne permite să economisim o cantitate importantă de diluant, deoarece este necesară adăugarea doar a unor cantităţi reduse din faza mobilă reînnoită pentru compensarea pierderii fazei mobile prin retragerea enantiomerilor dizolvaţi.

Un alt avantaj semnificativ al tehnologiei SMB este faptul că acesta este un proces continuu, în timp ce toate celelalte tehnici cromatografice sunt discontinue. Mişcarea în contracurent a fazelor mobile şi staţionare este simulată în următorul fel: faza staţionară este separată în câteva coloane cromatografice separate, care sunt conectate într-o serie ciclică. Fiecare intrare în coloană este echipată cu valve care permit completarea cu solvent şi alimentarea, precum şi extracţia produsului rafinat . Liniile de intrare şi ieşire vor fi schimbate după un interval de timp dat de la o coloană la următoarea coloană în direcţia fazei mobile, simulând astfel mişcarea fazei staţionare în direcţie opusă. După un ciclu complet, cele patru linii ajung în poziţia iniţială. Parametrii tehnologici de funcţionare a unui sistem SMB în condiţii optime poate fi calculat prin programe software disponibile bazate pe funcţii analitice.

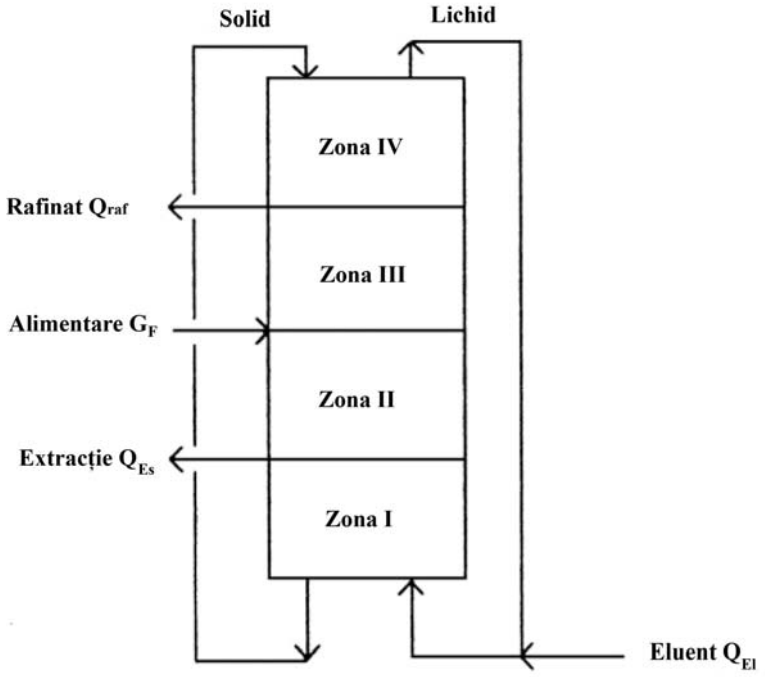


Fig. 7.5 Reprezentare schematică a unei unități SMB.[după Francotte , Richert ,1997]

În tabelul 7.1 sunt prezentate sumar câteva exemple de enantioseparare a medicamentelor chirale prin tehnica SMB. Per ansamblu, cromatografia SMB reprezintă un mijloc de mare capacitate pentru producția compuşilor enantiomeric puri la scară industrială, cu o dezvoltare într-un interval de timp scurt. Disponibilitatea programelor software ce permit determinările corespunzătoare pentru enantiosepararea analitică prin tehnologia SMB este un avantaj esențial. Caracteristicile cromatografiei SMB, respectiv asigurarea unor produşi (ambii enantiomeri) puri într-o manieră predictibilă şi reducerea pierderilor, reduce timpul necesar elaborării, indicând premizele unei tehnici promițătoare. Aplicabilitatea tehnologiei SBM unei mari varietăți de compuşi poate favoriza transformarea cromatografiei dintr-o metodă de ultimă instanță într-o metodă de elecție pentru desfăşurarea într-o manieră rapidă şi predictibilă a procesului.

SMB permite o scădere drastică a costurilor enantioseparării, în principal datorită reducerii volumelor fazei staționare chirale (CSP) (cu 50-60% mai mică decât în cazul HPLC) şi a consumului de dizolvant (cu până la 10 ori față de procedeul cromatografic discontinu).

Permite cote de producție de 10-100 tone pe an, cu costuri de separație de 30 dolari/kg enantiomer pur. Combinarea SMB cu tehnicile de racemizare sau cristalizare enantioselectivă este şi mai promițătoare. Câteva companii farmaceutice sau de chimie uşoară şi-au instalat unități SMB de capacități diferite. Printre primele a fost UCB Pharm (Belgia), care în 1997 a adoptat o unitate SMB la scară-largă pentru producția de medicament enantiomeric pur de ordinul tonelor. Cea mai mare unitate SMB este instalată de Aeroject Fine Chemicals (Rancho Cordova, CA) cu o capacitate de 50 tone de enantiomer pe an.

Tabelul 7.1 Exemple selectate ale aplicațiilor cromatografiei SMB în producția compuşilor enantiomeric puri. [după Chankvetadze , 2001])

Compus chiral	**CSP**	**Capacitate**	**Consum al fazei mobile (l/g)**
Aminoglutethimid	Chiralcel OJ	7,5 g/h·kg CSP	0,740 ml
1,1'-Binaphthyl-2,20-diol	Pirkle-type 3,5-DNBPG	2000 g separate pe zi	
Medicament chiral candidat (agonist parțial potent al receptorilor muscarinici)	Chiralpak AD	~30–60 g/h·kg	~0,190–0,380 ml
CGS 26 214	Chiralcel OJ	47 g/zi·kg	4,561
Cycloalkanon	Chiralcel OC	1082 g/zi·kg	0,280
DOLE	Chiralcel OF	272 g/zi·kg	0,440
EMD 53 986	poliacrilamida	319 g/zi·kg	2,540
EMD 53 986	Chiralpak AD	432 g/zi·kg	2,600
EMD 77 697	Chiralcel OD	451 g/zi·kg	1,640
EMD 122 347	Chiralpak AD	311 g/zi·kg	0.590
Formoterol	Chiralcel OJ	1,2 g/h·kg	0,515
Hetrazepina	triacetat de celuloză (CTA)	119 g/h·kg	0,094
Guaifenezina	Chiralcel OD	10,0 g/h·kg	0,380
Oxo-oxazolidina	L-Chiraspher	6,8 g/h·kg	0,900
Feniletilalcool	Chiralcel OD	0,98 g/l	5,300
Praziquantel	CTA	4,7 g/h·kg	0,056
Propranolol	Chiralcel OD	3,3 g/h·kg	0,200
Sandoz-epoxide	CTA	59 g/zi·kg	0,800
Sandoz-epoxide	Chiralcel OD	37 g/zi·kg	0,500
1a,2,7,7a-Tetrahidro-3-methoxi-napht(2,3–6) oxirane	CTA	1,45 g/h·kg	0,400
Threonina	Chirosolve L-prolina	Au fost separate 30 g	
Tramadol	Chiralpak AD	50 g/h·kg	0,500

Alături de companiile mai-sus menționate, Bayer (Leverkusen, Germany), Universal Pharma Technologies (Lexington, MA), Daicel (Himeji, Japan) şi alte câteva companii posedă unități SMB de capacități diferite. Recent, compania daneză H. Lundbeck a pus în funcțiune o unitate SMB cu o capacitate anuală de zeci de tone. Unitatea va fi folosită în producția celui mai bine vândut medicament al companiei, S-enantiomerul andidepresivului citalopram, care s-a pus în vânzare în locul formei racemice a citalopram începând din 2002.

Aşa cum am precizat mai sus în privința procesului SMB, liniile sunt schimbate sincron. În consecință, numărul de coloane din fiecare zonă rămâne acelaşi în fiecare moment, indiferent de locația liniilor de intrare/ieşire. Recent a fost propus un analog asincron al SMB, denumit VARICOL [Ludemann-Hombourger şi colab., 2000]. Prin numeroase calcule şi experimente s-a arătat că această tehnică oferă avantaje certe față de tehnologia SMB. Calculele numerice au indicat că un sistem VARICOL cu cinci coloane permite aceeaşi puritate a produsului ce poate fi atinsă cu SMB cu aceeaşi productivitate. La acelaşi număr de coloane şi aceeaşi puritate, productivitatea VARICOL este cu 18,5% mai mare.

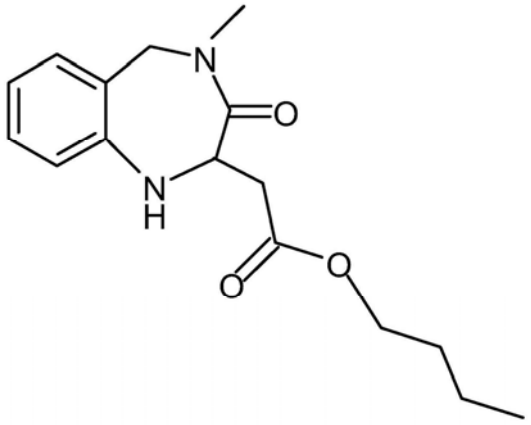


Fig. 7.6 Structura SB-553261 (după Ludemann-Hombourger şi colab.,2000)

Numărul coloanelor din aceeaşi zonă poate varia la sistemul VARICOL. Astfel unitatea VARICOL este mai complexă decât SMB, oferind o serie de avantaje: dacă este proiectat adecvat, fluxul de alimentare nu contaminează cursul de extracție sau rafinat, în zonele II, respectiv III numărul de coloane fiind temporar zero. Când

numărul de coloane din zonele I şi IV este egal cu zero fluxul de eluent nu va face o diluție suplimentară nedorită a componentei extrase sau rafinate.

Tabelul 7.2 Comparație între procesele SMB şi VARICOL (după Ludemann-Hombourger şi colab.,2002)

	Productivitate ***($kg_{prod}/kg_{CSP}/zi$)***	***Consum eluent*** ***(m^3_{eluent}/kg_{prod})***
SMB şase coloane (1/2/2/1)	0,604	0,922
VARICOL şase coloane ({1}/{2.25}/{2}/{0.75})	0,664	0,888
VARICOL cinci coloane ({0.95}/{1.85}/{1.5}/{0.7})	0,725	1,050
VARICOL patru coloane ({0.85}/{1.5}/{1.15}/{0.5})	0,906	1,392

Enantiomerii produsului SB-553261de cercetare a GlaxoSmithKline (fig. 7.6) au fost separați prin procesul VARICOL în amiloză tris (3,5-dimetilfenilcarbamat) (Chiralpak AD). Separarea SMB s-a putut realiza cu şase coloane, iar prin VARICOL cu şase, cinci sau patru coloane. Rezultatele comparative din tabelul 7.2 indică faptul că pentru un sistem de şase coloane (aceeaşi cantitate de CSP), VARICOL se comportă mai bine decât SB în materie de specificitate care este crescută şi de reducere a consumului de eluent. Prin precizia distribuției coloanelor în zone de lucru, VARICOL face posibilă reducerea numărului de coloane din sistem. Totuşi acest lucru se face cu prețul unui consum mai mare de eluent.

7.4.4.2. Alte tehnici cromatografice şi electroforetice pentru prepararea enantiomerilor

Cromatografia pe coloană de presiune joasă, cromatografia cu reciclare în circuit închis şi tehnicile de peak-shaving nu sunt discutate aici, nefiind utilizate frecvent datorită capacității reduse, consumului crescut de eluent şi costurilor ridicate. Mai jos sunt discutate pe scurt cromatografia contra-curent (CCC) şi enantioseparareа electroforetică de capacitate mică.

Relatând sumar situația în privința enantioseparării în CCC şi cromatografiei prin partiție centrifugă (centrifugal partition chromatography) (CPC), unul din experții în domeniu nota recent faptul că „un număr total de 18 publicații în 18 ani

constituie un rezultat modest față de literatura destinată celorlalte tehnici de separare chirală". Autorul, menționând potențialul CCC şi al CPC ca tehnici de preparare importante datorită capacității mari, al costurilor reduse ale fazei staționare (amestecul solvent) şi consumul redus de solvent (de 10 ori mai mic decât în cazul HPLC), accentuează eficiența mai degrabă scăzută ca principala problemă a enantioseparării prin aceste tehnici. În plus, recent a fost publicată o aplicație promițătoare a derivaților alcaloizi de cinchona ca şi selectori chirali în CCC [Franco şi colab., 2002].

Câteva rapoarte asupra enantioseparării medicamentelor chirale în cantități mari prin GC sau GC-SMB indică faptul că aceste tehnici pot fi utile pentru anumite aplicații speciale. Primul studiu destinat explorării potențialului clasicii electroforeze în plăci de gel pentru enantiosepararea în cantități reduse a fost publicat în 1998 de către Stalcup şi colaboratorii. Folosind exemplul agonistului β-2 adrenergic cu durată scurtă de acțiune terbutalina, s-a arătat că electroforeza în gel este într-adevăr o metodă viabilă de separare a compuşilor chirali în cantități de ordinul miligramelor. În acelaşi an grupul Thormann şi Stalcup şi colaboratorii au arătat faptul că dispozitive pentru electroforeza în mediu liber disponibile pentru comerț, precum RF3 şi MiniPhor de la Protein Technologies (Tucson, AZ) şi Mini Prep Cell de la Bio-Rad (Hercules, CA) pot fi utilizate pentru prepararea cantităților de ordinul miligramelor de enantiomeri. Fracțiile R-(–)- şi S-(+)- metadonei colectate într-un studiu au fost îmbogățite semnificativ la extremitățile anterioară şi posterioară, dar a fost imposibil să se obțină fracții enantiomeric pure.

Analiza CE a fracțiilor piperoxanului colectat în cantitate de 0,5mg într-un interval de migrare de 9-10 ore a arătat că fracțiile au fost aproape pure enantiomeric. Glukhovsky şi Vigh (1997) au descris enantiosepararea în cantități mici a DNS-Phe pe principiul focalizării izoelectrice şi folosind unitatea electroforetică de migrare în mediu liber Octopus, disponibilă comercial.

Alături de electroforeza în plăci de gel şi electroforeza în mediu liber, şi electroforeza capilară poate fi utilizată pentru separarea enantiomerilor în cantități mici. Bazându-se pe calcule teoretice, Kaniansky şi colaboratorii (1999) au

demonstrat că deobicei capacitatea probei poate fi de câteva ori mai mare când se execută o separare izotacoforetică în comparație cu electroforeza capilară zonală (CZE). În continuare, în sistemul experimental cu utilizarea unei combinații de 0,1mm I.D. şi 0,8mm I.D. capilare copolimer etilenă-propilenă fluorinate, au fost separate cantități de micrograme de 2,4-dinitrofenil-DL-norleucină cu puritate enantiomerică mare şi o recuperare de aproximativ 75% în 20 minute.

Chankvetadze şi colaboratorii (2001), lucrând la creşterea selectivității separării în electroforeza capilară bazată pe principiul contracurentului, a arătat că enantiosepararea continuă în cantități mici poate fi efectuată în format capilar prin folosirea contrapresiunii, presiunea hidrodinamică, curgerea electro-osmotică (EOF) sau proprietatea de „carrier" a unui selector chiral în contracararea mobilității împotriva mobilității electroforetice efective a enantiomerilor analizați. Aşa cum s-a arătat experimental în studiul lor, contrapresiunea poate fi ajustată de aşa manieră încât cei doi enantiomeri vor migra către electrozi opuşi sau doar un enantiomer va migra din recipientul de intrare către recipientul de ieşire. Glukhovsky şi Vigh (1997) au aplicat principiul migrării contra-curent pe baza proprietății de „carrier" a unui singur izomer al heptacis-(6-sulfato)-β-ciclodextrinei în combinație cu mai sus amintita unitate electroforetică Octopus şi au raportat enantiosepararea terbutalinei cu productivitate de 0,1mg/h (pentru fiecare enantiomer) şi o puritate enantiomerică de 99,99%. Schneiderman şi colaboratorii (2002) au raportat enantiosepararea electroforetică în cantități mici a medicamentului chiral Ritalina.

7.5. Bioanaliza medicamentelor chirale

Metodele de separare (GC, HPLC, SFC, CE şi CEC) reprezintă mijloace importante pentru bioanaliza enantioselectivă. Aceste tehnici sunt larg acceptate în laboratoarele universitare şi industriale şi îşi regăsesc locul în farmacopeele naționale şi internaționale, înlocuind tehnica tradițională polarimetrică. Toate tehnicile mai-sus menționate oferă avantaje ce țin de acuratețea înaltă, pierderile reduse de probe şi sensibilitatea ridicată (limită de detecție scăzută). Acoperirea substanțelor de analizat, flexibilitatea, robustețea, desfăşurarea metodei şi necesarul aplicației, costurile şi

aspectele ce țin de mediu sunt variabile de la metodă la metodă, iar alegerea metodei trebuie făcută pe baza problematicii specifice. Totuşi există unele direcții generale în aplicarea fiecărei metode, care sunt discutate în detaliu mai jos.

7.5.1. Cromatografia gazoasă (GC)

Dacă nu luăm în considerare puținele studii de început asupra cromatografiei plane şi pe coloană, GC reprezintă prima tehnică instrumentară care a făcut fezabilă enantiosepararea. Eficiența crescută în GC permite o enantioseparare chiar şi atunci când factorul de enantioseparare este scăzut (în jur de 1,1). GC a fost folosit relativ pe scară largă pentru analiza enantioselectivă a multor substanțe de importanță biomedicală şi a unor medicamente în anii '70 şi la începutul anilor '80.

GC chirală este utilă în special pentru gaze chirale pentru care este imposibilă analiza prin tehnici în fază lichidă. De exemplu, în figura 7.7 este prezentată enantiosepararea simultană a anestezicelor inhalatorii chirale desfluran, izofluran şi enfluran. Deşi enantiosepararea s-a realizat într-un timp scurt (sub 2,5min), autorii au putut scurta şi mai mult timpul de analiză a enfluranului, sub 10sec (fig. 7.8).

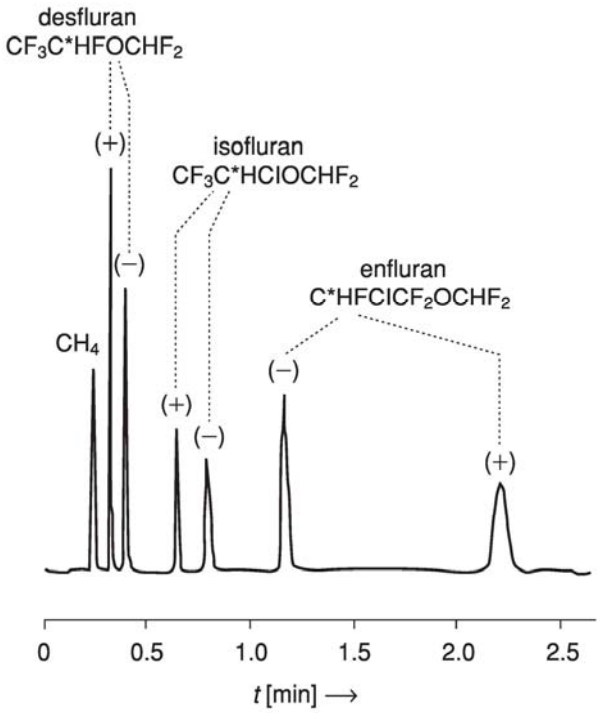


Fig. 7.7. Enantiosepararea simultană în GC a anestezicelor inhalatorii chirale (după Schurig şi colab. 1995)

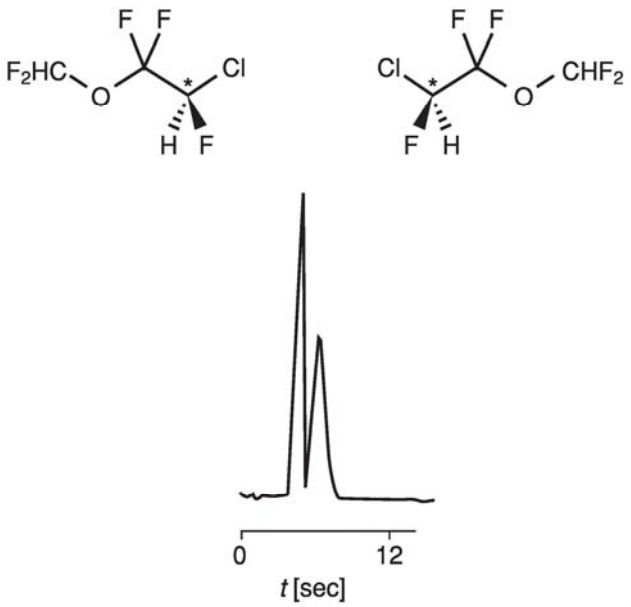


Fig. 7.8 Enantioseparareа enfluranului cu un timp de analiză foarte scurt (după Schurig şi colab. 1995)

Astfel de enantioseparări ultrarapide sunt, dacă nu cumva imposibile, cel puțin foarte greu de realizat în HPLC. Timpii de analiză foarte scurți pot fi avantajoşi când sunt monitorizate procese farmacocinetice rapide sau relații farmacocinetic-farmacodinamice în organismele vii.

Determinarea cantitativă a anestezicului inhalator izofluran în probele de sânge în timpul şi după intervenția chirurgicală s-a putut realiza prin GC enantioselectivă head-space (constituenții gazoşi ai unui spațiu închis deasupra unui lichid sau solid ce emite vapori) / spectrometria de masă (MS).

O tendință relativ recentă în domeniul GC enantioselective o constituie studiul de enantiomerizare prin cromatografia dinamică în gaz (DGC) sau cromatografia în gaz cu flux oprit (sfGC). Acest subiect este important deoarece multe reglementări cer ca „protocolul de stabilitate pentru substanțele sau produsele medicamentoase enantiomerice ar trebui să includă o metodă capabilă să aprecieze integritatea stereochimică a produsului sau substanței medicamentoase”.

În tabelul 7.3 sunt prezentate rezultatele determinării barierei de enantiomerizare a medicamentului chiral thalidomida . Alte exemple de acest fel sunt diazepinele chirale. Ambele tehnici mai sus amintite, DGC şi sfGC, necesită probe doar de câteva minute. În plus, în sfGC posibilul efect catalitic datorat prezenței unei CSP(faze staționare chirale) poate fi preîntâmpinat prin izolarea coloanei de separare de coloana rector. Doar câteva substanțe medicamentoase sunt compuşi gazoşi şi volatili. Metodele de obținere a compuşilor derivați sunt disponibile pentru unele substanțe de analizat care nu aparțin acestui grup. Oricum, acestea presupun costuri suplimentare, cu creşterea timpului de procesare, ele pot să nu respecte întotdeauna cantitățile implicate în proces şi pot afecta raportul enantiomeric din proba inițială. Din aceste motive GC acoperă doar un spectru redus în bioanaliza medicamentelor chirale în prezent, în timp ce tehnicile în fază lichidă precum HPLC şi CE predomină.

Tabelul 7.3 Comparație a barierelor de enantiomerizare a thalidomidei obținută prin cromatografie dinamică şi simulare pe computer cu ChromWin şi prin sfGC (după Trapp şi colab.2002)

T (°C)	***$\Delta G^{\neq}$(DGC) (kJ/mol)***	***$\Delta G^{\neq}$(sfGC) (kJ/mol)***
200	154±2	150±3
210	157±2	154±3
220	159±2	155±3

7.5.2. Cromatografia în lichid de înaltă performanță (HPLC)

HPLC reprezintă acum cea mai importantă tehnică de bioanaliză enantioselectivă în laboratoarele industriale . Ca avantaje, această tehnică este adecvată compuşilor nonvolatili şi termolabili, arată disponibilitate pentru serii mari de CSP şi coloane chirale, şi o bună compatibilitate cu probele biologice. În plus este disponibilă pentru o mare varietate de detectori sensibili şi precişi.

Atât HPLC normală cât şi cea în fază-inversă pot fi aplicate în bioanaliză. Totuşi cea de-a doua tehnică pare a fi mai avantajoasă datorită prelucrării mai simple a probelor. Probele biologice pot fi injectate direct în coloana de fază-inversă, după precipitarea proteinelor. Dacă sunt necesare, sunt posibile şi extracția de fază solidă

(SPE) şi preconcentrarea probelor. În cazul separării în fază normală, probele biologice trebuiesc extrase în solvenţi organici înainte de a fi injectate în coloana de separare. Acest lucru pare a fi laborios, necesită timp şi este costisitor. În plus mai pot să apară probleme din punct de vedere al recuperării probelor din matricea biologică. Aproape toate tipurile principale de CSP, utilizate iniţial doar în metoda separării în fază normală pot fi adaptate şi pentru aplicaţii în fază-inversă. Împreună cu metodele de separare mai sus amintite, aşa-numita metodă polar-organică a devenit din ce în ce mai populară în ultimul deceniu. Ea presupune folosirea unui singur solvent organic polar (de obicei metanol, etanol 2-propanol sau acetonitril) sau amestecuri ca şi faze mobile. Avantajele metodei ar fi creşterea numărului de CSP adecvate, în unele cazuri selectivităţi unice, care nu sunt întâlnite nici în cazul fazei normale, nici cu eluenţi apoşi-organici, factori de separare foarte mari observaţi pentru substanţe de analizat selecţionate şi compatibilitate bună cu tipuri variate de detectori, în special cu spectrometrele de masă. De asemenea, alcoolurile cu masă moleculară mică (ca şi fază mobilă), sunt mai puţin poluante decât acetonitrilul sau agenţii dizolvanţi clorinaţi.

Coloana chirală este cea mai importantă componentă a sistemului de enantioseparare HPLC . Numărul de CSP descrise în literatura din domeniu se apropie de 200. Pe de o parte, aceasta ilustrează marea capacitate a tehnicii, dar pe de altă parte, face extrem de dificilă alegerea CSP optime. Nu există date teoretice care să permită alegerea coloanei pe baza structurii substanţei de analizat. Totuşi, apelând la bazele de date existente şi prin abordări statistice / chemometrice, se poate anticipa destul de bine un sistem de separare.

Dintre CSP (faze staţionare chirale) care sunt disponibile în comerţ în mod curent, CSP cel mai mult utilizate în bioanaliză includ materialele pe bază de polizaharide precum Chiralcel OD, Chiralpak AD, Chiralcel OJ and Chiralpak AS. CSP pe bază de antibiotice macrociclice precum vancomicina şi teicoplanina şi coloana chirală tip Pirke modificată Welk-1 sunt de asemenea bine studiate pentru studii bioanalitice.

CSP pe bază de polizaharide au fost elaborate pentru aplicații în fază normală. Totuşi, aşa cum arată studii recente, aceste materiale sunt foarte versatile şi sunt folositoare şi în aplicații în fază-inversă.

Hage (2001) a prezentat câteva exemple ale aplicaților CSP pe bază de ciclodextrină pentru bioanaliza enantioselectivă . În schimb, aplicațiile materialelor pe bază de proteine sunt în scădere. Totuşi, cele mai noi dintre CSP par a fi foarte utile în studierea aspectelor stereoselective ale interacțiunilor proteină – medicament.

Alături de cele prezentate mai sus, CSP pe bază de cinchona recent comercializată pare a fi de real interes pentru studii bioanalitice de enantioselectivitate.

Cea mai recentă direcție din domeniul materialelor pe bază de polizaharide o reprezintă imobilizarea covalentă a acestora cu scopul de a lărgi sfera de aplicabilitate a fazelor mobile către aplicații la scară analitică (cantități mici) şi preparativă (cantități mari). Miniaturizarea a devenit o tendință majoră în HPLC în ultimii ani şi este intens promovată prin cele mai recente progrese în domeniile proteomicii, genomicii, metabonomicii, sintezei combinative şi a tehnologiilor cu circuite integrate (cip-uri). Această tendință nu este încă suficient de puternică în HPLC chirală. Doar câteva grupuri ce lucrează în domeniul CEC chirale fac cercetări şi în LC capilară. Această direcție de dezvoltare ar merita mai multă atenție deoarece, cele mai recente progrese din domeniul cercetării proteomicii şi sintezei combinative vor pune în discuție aceleaşi necesități vizând rapiditatea, economia, eficiența, înalta sensibilitate şi poluarea redusă a mediului pentru separarea chirală, deoarece multe dintre substanțele candidate pentru a deveni medicamente sintetizate prin procedee combinative, ca şi compuşii de origine biologică, sunt chirale. Metodele de separare capilare combinate cu interfețe nanospray par a fi mai sensibile decât cele cu coloane de dimensiuni obişnuite.

Tendințele actuale ale bioanalizei enantioselective cuprind combinații ale HPLC şi MS, detectori fluorescenți laser ultra-sensibili şi polimeri imprimați molecular pentru prepararea / preconcentrarea probei prin intermediul computerului.

7.5.3 Electroforeza capilară (CE)

CE reprezintă o tehnică eficace de enantioseparare analitică. Aplicațiile acestei tehnici sunt prezentate în review-uri recente [Scriba , 2002; Amini , 2001]. În acest capitol se fac referiri la caracteristicile CE şi tehnicilor de enantioseparare cromatografice folosind ca exemple câteva aplicații recente ale CE chirale în analiza biomedicală şi farmaceutică. Se vor discuta criterii cum ar fi oportunitatea probelor de interes, rata de succes (puterea de separare, sensibilitatea), fiabilitatea rezultatelor (acuratețea, reproductibilitatea), uşurința în a învăța şi a folosi tehnica, viteza (de învățare a tehnicii şi de desfăşurare a metodei), poluarea mediului (materiale periculoase utilizate şi gradul lor de periculozitate), costurile (echipamente, consumabile necesare cum ar fi selectori chirali, medii tampon, accesorii etc.) şi acceptarea în mediul universitar şi în cel industrial.

CE chirală pate fi folosită în stadiile timpurii ale conceperii şi perfecționării unui medicament (sinteza unui candidat pentru un viitor medicament chiral), în procesul de producție al unui medicament chiral, studii de formulare, studii de fază preclinică şi clinică, precum şi depozitarea şi utilizarea medicamentului.

În fazele precoce ale sintezei unui medicament enantiomerii sunt detectați ca şi compuşi chirali puri sau ca mixturi, împreună cu alți intermediari sintetici şi produşi secundari. Pentru acest gen de substanțe de analizat, CE asigură avantaje față de GC (cu excepția celor câteva anestezice gazoase mai sus amintite) şi este cel puțin la fel de adecvată ca şi HPLC. Cerințe precum eficiența crescută a separării, selectivitatea crescută, automatizarea, etc. sunt chiar mai bine îndeplinite prin CE decât prin HPLC.

Formele de prezentare ale medicamentelor solide (dar şi a unor lichide) conțin în mod obişnuit o matrice (derivați celulozici, amidon, oligozaharide cu greutate moleculară mică etc.) care pot să creeze anumite probleme datorită adsorbției acestora la nivelul peretelui intern capilar şi să afecteze EOF. Compuşii cu greutate moleculară mare pot da probleme şi în cazul HPLC (contaminarea coloanei, adsorbția ireversibilă a fazei staționare, precipitarea pe filtru etc.). O posibilă soluție pentru aceste probleme în CE ar putea fi pre-acoperirea peretelui capilar. Ca soluție

alternativă, ingredientele matricei pot fi îndepărtate de pe probă prin diverse metode de pre-tratare ale probei (filtrare prin membrane, extracție lichid-lichid etc.).

În studii de fază preclinică şi clinică o substanță candidată pentru a deveni medicament, posibilii săi metaboliți (faza I şi faza II) trebuie determinați în medii biologice precum plasmă, ser, urină, salivă LCR şi omogenate tisulare. Majoritatea acestor probe sunt mai compatibile cu CE decât cu tehnicile cromatografice. Constituenții plasmatici cu greutate moleculară mare pot fi sursa unor probleme asemănătoare polizaharidelor mai sus menționate datorită adsorbției acestora pe peretele capilar intern.

Medicamentul sursă poate avea structură polară sau poate suferi transformări metabolice către compuşi cu astfel de structură. Acestea pot avea loc în special pentru metaboliți de fază II precum glucuronoconjugați, sulfați, mercapturați etc. CE este tehnica de elecție pentru analiza compuşilor ce pun astfel de probleme.

Desigur, este foarte dificil ca prin GC şi HPLC să se poată realiza enantioseparareа unui medicament chiral sau a metaboliților săi de ordinul I sau II din prima etapă de separare. Totuşi, acest lucru este posibil prin CE chirală. Figura 7.9 prezintă ca exemplu enantioseparareа simultană a metaboliților de ordinul I şi II ai antihistaminicului chiral dimetindena. Astfel, aşa cum ilustrează acest exemplu, CE poate funcționa mai bine pentru un medicament chiral şi metaboliții săi ce au polarități diferite. Rata de succes a metodei este unul din cele mai importante criterii de selecție a unei tehnici analitice. Aşa cum a fost menționat în subcapitolul precedent, numărul de CSP pentru procedeele de enantioseparare descrise în literatură ating numărul de 200. Numărul de selectori CE chirali efectivi este mai scăzut. Deşi CE permite un screening al selectorilor chirali mult mai rapid şi mai eficient din punct de vedere al costurilor în comparație cu HPLC iar perfecționarea metodei în cazul CE poate fi mult mai redusă ca durată în general şi doar în cazul a doi enantiomeri ratele de succes pentru cele două tehnici par a fi comparabile. Totuşi, superioritatea metodei CE față de HPLC devine evidentă în cazul în care este necesară separarea şi enantioseparareа simultană a amestecurilor ce conțin medicamentul chiral sursă, metaboliții săi de ordinul I şi II, intermediarii sintetici şi /

sau produşii de degradare. În Figura 7.9 este prezentat ca exemplu enantiosepararea simultană a metaboliților de ordinul I şi II ai antihistaminicului chiral dimetindena. Un alt exemplu al unei enantioseparări mai complexe este prezentat în figura 7.10.

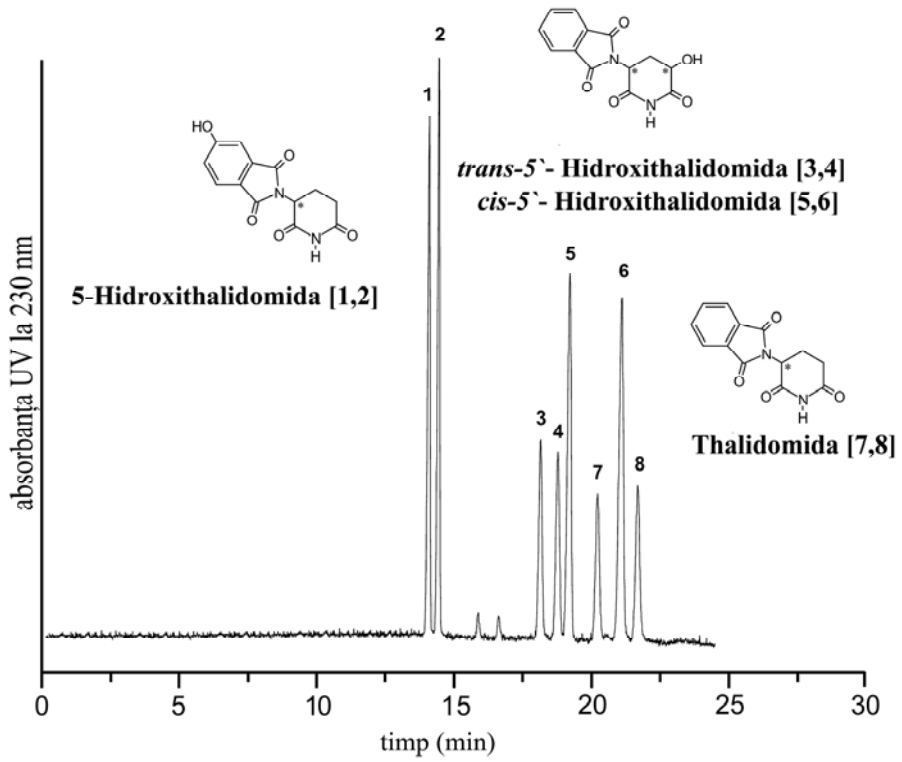


Fig. 7.9 Enantiseparare simultană prin CE a metaboliților de ordinul I şi II ai dimetindenei: 1,6-hidroxidimetindina; 2,6-hidroxi-N-demetildimetindina; 3,6-hidroxidimetindin-glucoronid; 4,6-hidroxi-N-demetildimetindina-glucoronid (după Rudolf , Blaschke 1999)

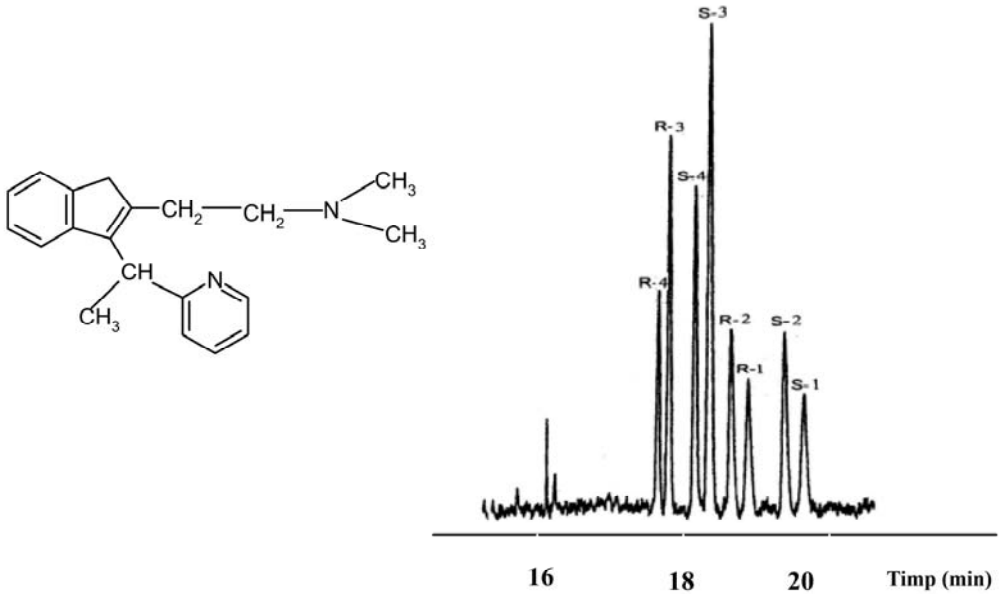


Fig. 7.10. Enantiosepararea simultană prin CE a thalidomidei şi a metaboliților ei de fază I (după Meyring şi colab.,1999)

Enantiosepararea thalidomidei prin HPLC, CE sau CEC nu constituie o problemă. Mai dificilă este mai degrabă enantiosepararea simultană a thalidomidei şi metaboliților importanți ai acesteia ce au fost detectați recent în probe de plasmă şi ficat, incubate cu fracțiunea S9, ce conțin amestec racemic de thalidomidă, provenite de la voluntari de sex masculin cărora li s-a administrat per os thalidomidă racemică.

Thalidomida a fost retrasă în 1961 datorită potențialului său teratogen. Totuşi, acest compus are efecte remarcabile împotriva leprei, inhibă HIV-1, inhibă eliberarea TNF-α etc. Recent, thalidomida a fost aprobată de către FDA pentru tratamentul erythema nodosum leprosum. Astfel, investigațiile asupra mecanismelor teratogene ale acestui medicament sunt foarte importante. Metaboliții thalidomidei par a fi agenții potențial teratogeni, aceştia formându-se stereoselectiv. Înseamnă că unii metaboliți se formează în principal prin transformarea metabolică a (R)- iar ceilalți a (S)-thalidomidei. Pentru a putea urmări fenomenul, este necesară o metodă pentru enantiosepararea simultană a thalidomidei şi a metaboliților acesteia. Toate încercările experimentale de separare şi enantioseparare a thalidomidei şi a celor trei metaboliți importanți ai acesteia într-o singură etapă de lucru folosind fie HPLC cu coloană chirală, fie CE cu un singur selector chiral în modul normal de polaritate, au eşuat. Totuşi, au putut fi toate separate într-o singură etapă folosind CE cu o combinație de doi selectori chirali (Fig. 7.10). În tehnicile cromatografice este posibilă şi o combinare a doi selectori chirali prin schimbarea coloanelor. Totuşi această tehnică este asociată cu câteva probleme tehnice (presiune retrogradă crescută, creşterea volumului mort, dispersia în exces a vârfurilor etc.). în plus, selectorii chirali pot fi amestecați în CE în orice raport dorit (aspect limitat doar de solubilitate). Acest lucru este dificil şi consumă mult timp în HPLC şi GC.

Comparând selectorii chirali ce exprimă aceeaşi enantioselectivitate termodinamică de recunoaştere într-un experiment în condiții ideale, devine clar faptul că rata de succes a unei enantioseparări este mult mai mare în CE decât în HPLC. Acest avantaj este explicat prin faptul că eficiența de vârf este mult mai mare în CE iar factorul de solubilizare creşte proporțional la $N^{1/2}$. În plus, interacțiunile selector – selectat pot fi enorm intensificate în CE prin creşterea concentrației

selectorului chiral. Acest lucru poate fi limitat de către solubilitatea unui selector chiral, vâscozitatea mare a electrolitului de fond sau curentul crescut în cazul selectorilor chirali încărcați (ionic). Totuşi, suporturile de migrare sunt destul de cuprinzătoare pentru optimizarea separării. Astfel, puterea de separare a CE este în mod cert mai mare iar instrumentele disponibile pentru ajustarea unei separări chirale sunt mult mai numeroase decât în cazul tehnicilor cromatografice.

Reproductibilitatea timpilor de migrare şi a separării în întregime au fost motive de incertitudine în CE timp îndelungat. Totuşi, aşa cum indică cele mai recente progrese, acesta nu mai este un aspect critic. Pentru eliminarea intervenției peretelui capilar asupra motilității substanței analizate, au apărut câteva tehnici eficiente, fie prin ajustarea motilității EOF, fie prin supresia acesteia. În plus, selectorii chirali utilizați în CE devin din ce în ce mai bine şi mai uniform caracterizați. Ambele tendințe descrise facilitează evoluția către buna reproductibilitate a metodelor CE chirale.

Sensibilitatea a fost considerată o problemă majoră în CE timp îndelungat şi „ este improbabil ca CE chirală va fi folosită în bioanaliza medicamentelor deoarece enantiomerii trebuie determinați la niveluri foarte scăzute, adesea de ordinul ng/ml”. Cele mai recente progrese din acest domeniu contrazic practic această idee, iar CE chirală este aplicată cu mare succes în domeniul bioanalizei. Există o serie de metode de preconcentrare a probelor precum (micro)extracția capilară pe fază solidă, filtrarea / preconcentrarea pe membrană, „aşezarea” probei şi maturarea probei. În plus, trebuie să luăm în considerare şi o mare varietate de celule de detecție cu un interval de detecție optică extins. Comparând limita de detecție (LOD) în CE şi HPLC, trebuie să luam în considerare că o zonă de probă eluează sub forma unui vârf mult mai ascuțit într-un interval de timp mult mai scurt şi este mult mai puțin diluată în CE decât în HPLC. Însă cel mai important argument în favoarea unui viitor promițător al CE chirale în bioanaliza medicamentelor este faptul că această tehnică este compatibilă cu o metodă de detecție atât de sensibilă, specifică şi universală precum MS.

Un alt aspect al sensibilității ce nu poate rămâne în afara scopului acestei discuții este următorul. În majoritatea cazurilor este importantă detecția impurității enantiomerului minor în prezența celui major. De aceea, se poate întâmpla ca limita de detecție a impurității enantiomerului minor în prezența celui major să devină un obiectiv mai important decât LOD de ansamblu. În acest caz, în final factorul de separare va deveni la fel de important pentru succesul metodei ca şi sensibilitatea de ansamblu a sistemului. Acest lucru se întâmplă deoarece metoda trebuie să permită o diferență suficientă între timpii de migrare a doi enantiomeri pentru a permite detecția enantiomerului minor fără suprapunerea acestuia cu cel major. În acest caz poate fi foarte utilă şi ajustarea secvenței de migrare a enantiomerilor. CE asigură avantaje evidente față de HPLC atât pentru optimizarea separării cât şi pentru proiectarea secvenței de migrare a enantiomerilor.

Remarcabila simplitate a tehnicii CE este fascinantă. Nu sunt necesare pompe, valve şi nici celule de detecție separate. Astfel, pe lângă simplificarea metodologiei experimentale, sunt eliminate sursele suplimentare de lărgire a peak-ului datorat injectării probei şi detecției. Un singur set de materiale poate fi folosit cu succes nu doar pentru efectuarea a diverselor moduri de separare CE (electroforeză capilară zonală, cromatografie capilară electrokinetică micelară, izotacoforeză capilară, focalizare capilară izoelectrică, electroforeză capilară în gel), dar şi separări prin HPLC şi CEC . CE este mai rapidă decât tehnicile cromatografice din punct de vedere al elaborării metodologiei. Schimbarea şi întreținerea unei coloane în cromatografie necesită mult timp. În schimb, în CE, schimbarea unui capilar şi/sau unui selector chiral necesită doar câteva minute. CE necesită cantități mici de solvenți, ca tehnică microanalitică, fiind nepoluantă şi ieftină. Cantitățile foarte mici de selectori chirali şi soluții tampon atrag reduceri suplimentare ale costurilor. Este permisă astfel studierea proprietăților de recunoaştere chirală ale unor materiale scumpe sau/şi rare, disponibile doar în cantități mici. Capilarele din siliciu topit folosite în CE sunt relativ ieftine, ca şi majoritatea accesoriilor. Echipamentul de bază pentru CE de calitate medie nu costă mai mult decât instalația HPLC sau GC, însă costurile de utilizare pentru acestea din urmă depăşesc pe cele ale CE.

În prezent în laboratoarele universitare CE este acceptată. În industrie HPLC rămâne principala tehnică de separare chirală. Însă având în vedere experiența din instituțiile academice, se pare că e foarte probabil ca în viitorul nu prea îndepărtat CE va deveni tehnica de elecție pentru enantiosepararea analitică în industriile farmaceutică, chimică, alimentară , agrochimică, dar şi în laboratoarele clinice şi de bioanaliză.

7.5.4. Electrocromatografia capilară (CEC)

În subcapitolul 7.5.3 au fost evidențiate câteva avantaje mai importante ale CE față de HPLC şi GC în enantioseparare. Avantajele mai sus amintite sunt datorate prezenței unui selector chiral mobil în cazul CE, ca şi pentru mecanismul de separare electrokinetic, în comparație cu suportul staționar în cazul tehnicii cromatografice. Pe de altă parte, selectorul chiral mobil nu este ideal deoarece: (1) trebuie să fie schimbat după fiecare analiză, ceea ce duce la un consum crescut de selector chiral şi dificultăți de reproductibilitate de la determinare la determinare pentru o separare dată şi (2) prezența unui selector chiral în capilarul de separație creează probleme semnificative în cuplarea CE cu un spectrometru de masă şi face practic imposibilă utilizarea detectorilor chiroptici în CE. Din acest motiv, la începutul anilor '90 a fost introdusă o tehnică hibridă între HPLC şi CE, denumită „CEC”. De la această tehnică se aşteaptă să combine eficiența înaltă caracteristică mijloacelor de separare potențate electric cu selectivitatea de separare ridicată a CSP disponibile în HPLC. În plus, suportul staționar ne permite evitarea problemelor mai sus amintite legate de aplicarea selectorului chiral mobil în CE. Evoluția recentă a CEC chiral au fost prezentate sumar în câteva articole review-uri [Lämmerhofer şi colab., 2002].

Deşi CEC chiral a fost utilizat cu succes la enantiosepararea substanțelor de analizat cu diverse structuri, în literatură sunt publicate doar câteva aplicații pentru probleme ale analizei în domeniile farmaceutic, biomedical şi mediu înconjurător. Doar o publicație prezintă o încercare nu prea reuşită de enantioseparare simultană a thalidomidei şi metaboliților hidroxilați de fază I ai acesteia [Meyring şi colab., 2000]. În acest studiu, CSP a fost un amestec destul de complex între doi derivați

polizaharidici. În afară de acest exemplu, a fost publicată o încercare validată de CEC pentru enantiomerii β-blocantului metoprolol folosind CSP ce conțin vancomicină în modul polar-organic [Carlsson şi colab., 2000]. Altă lucrare descrie enantioseparareа antidepresivului venlafaxina şi a principalului său produs metabolic , folosind tot CSP pe bază de vancomicină. Metoda a fost aplicată şi pe probe de plasmă a unor pacienți sub tratament cu venlafaxină [Fanali şi colab., 2001]. Alături de aplicațiile acesteia pe medicamente pure şi probe biologice, CEC poate fi aplicată şi pentru controlul purității enantiomerice al formelor de prezentare ale medicamentelor chirale, aşa cum s-a arătat în cazul contraceptivului Tigoa ce conține levonorgestrel şi etinilestradiol ca şi ingredienți activi.

Alte aplicații ale CEC legate de unele dificultăți existente în domeniul farmaceutic şi biomedical vor apărea în viitorul apropiat. Această concluzie optimistă este susținută de numeroasele aplicații ale acestei tehnici în separarea amestecurilor racemice standard ale enantiomerilor, de timpii de analiză scăzuți descrişi deja în cazuri selecționate şi de o mai bună înțelegere a mecanismelor subsidiare ale CEC (chirală).

7.6. Perspective

Analiza celor mai recente progrese în domeniul enantioseparării indică o continuă creştere a importanței acordate dezvoltării de noi medicamente şi a eficienței în utilizarea celor în uz. Tehnicile miniaturizate de analiză cum ar fi CE, LC capilară şi CEC care funcționează cel puțin la fel de bine ca şi HPLC, vor deveni mai importante. Tehnicile miniaturizate sunt mai flexibile, mai ieftine şi mai puțin poluante. Pentru aplicații în domeniul producției medicamentelor chirale enantiomeric pure, cromatografia SMB şi variantele sale mai eficiente în anumite cazuri sunt aparent mai avantajoase decât cristalizarea diastereomerică, separarea enzimatică, rezerva chirală şi sinteza catalitică asimetrică. Totuşi, decizia finală trebuie luată de la caz la caz, ținând cont de timp, etapele elaborării medicamentului, aspectele economice, nivelul producției etc.

CAPITOLUL 8

CROMATOGRAFIA DE AFINITATE: APLICAȚII ÎN BIOFARMACEUTICĂ

8.1. Introducere

Conform definiției IUPAC, termenul „cromatografie de afinitate" caracterizează varianta particulară de cromatografie în care pentru separare este utilizată specificitatea unică a interacțiunilor substanța de analizat – ligand. Ligandul este imobilizat pe un suport solid iar substanța de analizat (de cele mai multe ori o proteină) este adsorbită specific la trecerea pin coloană. Eluția de pe suportul de afinitate se realizează într-o etapă separată în condiții definite. În timp ce inițial noțiunea descria interacțiuni biologice sau biospecifice cum ar fi legarea dintre o enzimă şi substratul acesteia sau anticorpului cu antigenul, termenul este acum folosit şi când sunt implicați liganzi non-biologici, ca de exemplu liganzi precum borați, complexe ionice metalice sau vopseluri sintetice.

Tehnica a fost utilizată încă din 1910 când Starkenstein a izolat α-amilaza prin adsorbția pe amidon, însă conceptul modern şi termenul ca atare au fost introduse de Cuatrecasas şi colab., (1968). În acelaşi timp s-a dezvoltat tehnica activării polizaharidelor cu cianură de brom, fapt ce a permis cuplarea nucleofilelor la o matrice de afinitate. De atunci au devenit cunoscute multe alte tehnici de cuplare şi au fost comercializate multe suporturi activate şi matrice. S-a estimat că peste 60% din protocoalele de purificare a proteinelor publicate implică cromatografie de afinitate. Datorită specificității, moleculele țintă pot fi izolate dintr-un amestec foarte complex de compuşi adesea foarte apropiați ca structură, cu un randament al purificării de sute până la câteva mii într-o singură etapă. În acelaşi timp se poate face şi concentrarea compusului de interes.

Aceste avantaje au determinat o largă răspândire a aplicațiilor cromatografiei de afinitate în biochimie, farmaceutică, ca şi în chimia mediului sau cea clinică. De la doar două lucrări pe tema tehnicii, listate în *Chemical Abstracts* şi Medline în 1968 când se puneau bazele tehnicii, în 2001 la căutarea termenului „cromatografie de afinitate" bazele de date arată 1383 rezultate (Chemical Abstracts), respectiv 666 rezultate (Medline).

Pentru a enumera doar câteva, au fost recent publicate cărți [Bailon şi colab., Affinity Chromatography, Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, 2000], capitole de cărți precum şi o întreagă ediție pe tema acestei tehnici. Acest capitol face o scurtă sinteză a principiilor şi a celor mai importante metode ale cromatografiei de afinitate, ținând cont de utilizarea acestei tehnici în chimia medicală şi/sau purificarea proteinelor în farmaceutică, precum şi de aplicațiile analitice.

8.2. Principiile cromatografiei de afinitate

Spre deosebire de „convenționalele" faze staționare care separă substanțele de analizat pe baza încărcării electrice sau a proprietăților hidrofobe / hidrofile, cromatografia de afinitate se bazează pe interacțiuni specifice a unei regiuni definite a unei biomolecule cu un ligand.

Biomolecule cum ar fi proteinele au caracteristici unice ale distribuției încărcării, a domeniilor hidrofobe şi a celor hidrofile, rezultate din resturile de aminoacizi expuşi la suprafața situsurilor active. Ligandul, ce poate fi o moleculă mică sau o altă macromoleculă, interacționează în mod complementar cu situsurile respective de legare. Complexul este format printr-o combinație de interacțiuni de tip electrostatic, punți de hidrogen, hidrofobe şi van der Waals. Cum, de multe ori doar forma activă a unei biomolecule îşi expune situsurile de legare corespunzătoare, tehnica poate fi folosită şi pentru separarea formei active de conformațiile inactive.

Exemple de perechi ligand – substanță dizolvată utilizate în cromatografia de afinitate sunt prezentate în tabelul 8.1.

Tabelul 8.1. Exemple de complexe ligand – substanță dizolvată utilizate în cromatografia de afinitate

Ligand	***Substanțe dizolvate reținute***
Anticorpi	medicamente, hormoni, peptide, proteine, celule, virusuri
Substraturi, inhibitori, cofactori, coenzime	enzime, receptori, proteine carrier
Lectine	polizaharide, glicoproteine, glicolipide, receptori celulari de suprafață
Acizi nucleici	proteine de legare a acizilor nucleici, secvențe complementare de baze
Proteina A, proteina G	imunoglobuline
Coloranți triazinici	proteine şi enzime de legare a nucleotidelor
Chelatori metalici	peptide şi proteine ce conțin resturi histidinice, cisteinice şi/sau de triptofan, proteine de fuziune His
Borați	zaharuri, glicoproteine

Principiul cromatografiei de afinitate este schițat în figura 8.1. Ligandul este imobilizat pe un suport solid plasat într-o coloană cromatografică.

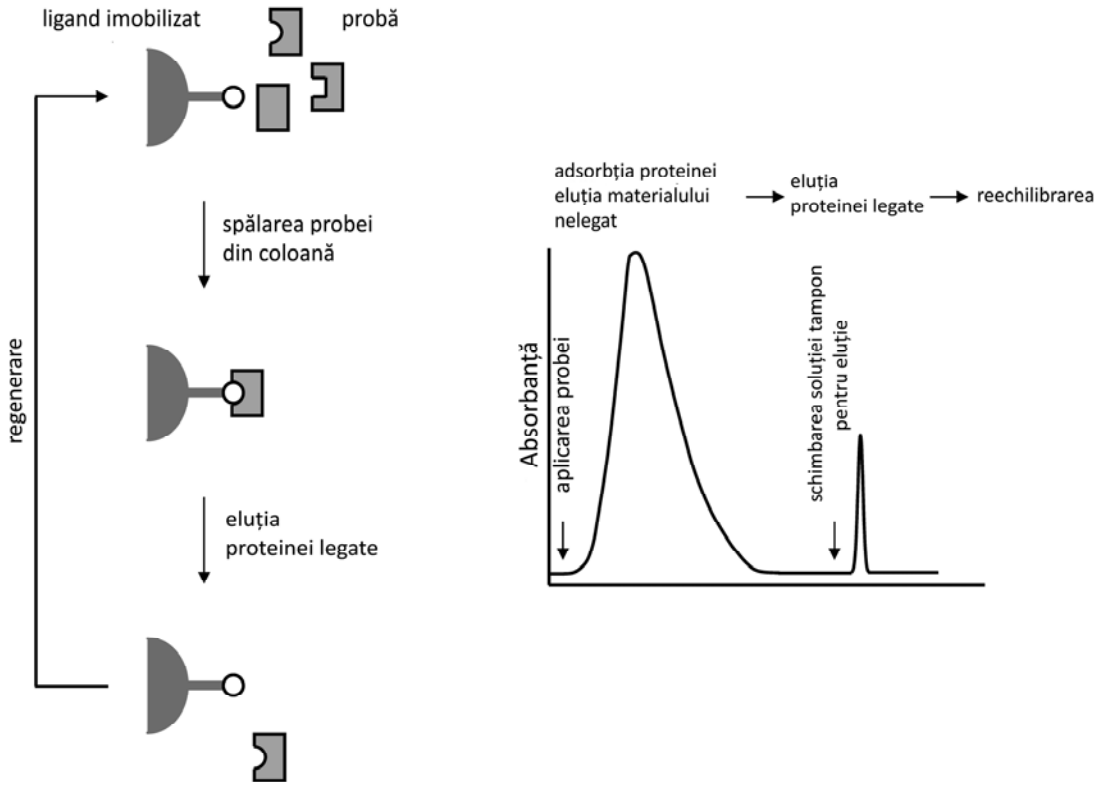


Fig. 8.1 Principiile cromatografiei de afinitate

La aplicarea probei, numai molecula capabilă de interacțiuni specifice cu ligandul este reținută pe coloană în timp ce restul componentelor sunt dizolvate împreună cu fracțiunile ce sunt îndepărtate. Dizolvarea moleculei legate se realizează prin întreruperea interacțiunilor ligand–substanță dizolvată consecutivă unei modificări a diluantului, cum ar fi creşterea încărcării ionice a substanței tampon sau adăugarea de ligand la faza mobilă. Coloana de afinitate poate fi reutilizată după o regenerare corespunzătoare.

Retenția sau eluția unui compus pe o coloană de afinitate depind de intensitatea interacțiunilor ligand–subtanță dizolvată, cantitatea de ligand imobilizat şi cinetica asocierii şi disocierii complexului. Considerând un singur situs de legare ce determină un raport 1:1 de formare a complexului între un dizolvant S şi un ligand L, formarea complexului poate fi descrisă prin relația:

$$[\mathrm{S}] + [\mathrm{L}] \underset{k_\mathrm{D}}{\overset{k_\mathrm{A}}{\rightleftarrows}} [\mathrm{S} \cdot \mathrm{L}] \tag{1}$$

$$K_\mathrm{A} = \frac{k_\mathrm{A}}{k_\mathrm{D}} = \frac{[\mathrm{S} \cdot \mathrm{L}]}{[\mathrm{S}] + [\mathrm{L}]} \tag{2}$$

$$K_\mathrm{D} = \frac{1}{K_\mathrm{A}} \tag{3}$$

unde [S] este concentrația substanței dizolvate în faza mobilă, [L] şi [S·L] reprezintă concentrațiile de suprafață ale ligandului, respectiv complexului ligand–substanță dizolvată. k_A şi k_D sunt constantele de asociere şi disociere ale reacțiilor, iar K_A este constanta de asociere a complexului. Menținerea echilibrului soluției este definită prin relația:

$$k' = \frac{K_\mathrm{A} \cdot m_\mathrm{L}}{V_\mathrm{m}} = \frac{t_\mathrm{r}}{t_\mathrm{m}} - 1 \tag{4}$$

unde k' este factorul de capacitate al substanței dizolvate, m_L reprezintă molii de ligand din coloană, V_m este volumul neocupat al coloanei, t_r este timpul de retenție al substanței dizolvate (SD), iar t_m este timpul nul al coloanei. Astfel, factorul de capacitate al unei anumite SD depinde de valoarea constantei de asociere şi de

cantitatea de ligand din coloană. Considerând o constantă de asociere (K_A) de 10^8 - 10^9 M^{-1} şi o concentrație a ligandului (m_L/V_m) de 10^{-5} M, k' devine 1000 – 10.000, iar tipul de eluție a substanței analizate legate va tinde către câteva zile.

Singura modalitate de a realiza eluția într-un interval de timp rezonabil este prin modificarea variabilelor astfel încât constanta de asociere să fie micşorată considerabil în condiții experimentale. Acest lucru se poate obține prin schimbarea soluției tampon de eluție fie intr-o singură etapă, fie gradual. Din motivele cele mai practice, constanta de asociere K_A ar trebui să fie egală sau mai mare decât 10^5 -10^6 M^{-1}, ceea ce corespunde unei constante de disociere K_D de 1-10 μM, pentru a asigura buna adsorbție a substanței de analizat.

Totuşi, chiar şi o valoare K_A în intervalul 10^3 -10^6 M^{-1} poate avea ca rezultat o întârziere convenabilă a proteinei de interes dacă densitatea ligandului este suficient de mare. Pe de altă parte, având interacțiuni ce depăşesc 10^{10} -10^{11} M^{-1}, vor fi necesare condiții severe de eluție a proteinei legate, ceea ce va determina denaturarea proteinei. Constante de disociere în intervalul 10^{-3} - 10^{-5} M (ce se transpun în K_A= 10^3 - 10^5 M^{-1}) sunt în general adecvate pentru eluția în condiții blânde, fără denaturare a proteinelor.

8.3. Ligandul

Alegerea ligandului de afinitate este cea mai importantă pentru matricea de afinitate, afectând specificitatea de legare, procesul de imobilizare şi costul matricei. Un bun ligand îndeplineşte următoarele criterii [Carlsson şi colab. 1998] :

- ligandul trebuie să formeze complexe reversibile cu proteina pentru a fi izolat sau separat cu o specificitate adecvată pentru aplicația urmărită;
- stabilitatea complexului ar trebui să fie destul de crescută încât să asigure o întârziere cromatografică suficientă a proteinei;
- complexul ar trebui să fie uşor de disociat printr-o schimbare a soluției tampon, fără ca aceasta să afecteze stabilitatea proteinei ce trebuie izolată sau a ligandului;

- ligandul trebuie să aibă proprietăți adecvate pentru a-i permite imobilizarea pe suport;
- ideal, ligandul ar trebui să fie ieftin şi uşor disponibil.

Pe baza tipului de interacțiuni ce îi caracterizează, liganzii se pot clasifica în biospecifici, biomimetici, respectiv liganzi pseudospecifici. Exemple de liganzi biospecifici sunt anticorpii, substraturile sau coenzimele, liganzii biomimetici cuprind solvenții, iar natura interacțiunilor cu chelatori metalici este de tip pseudospecific. Totuşi, mai obişnuit liganzii sunt clasificați ca monospecifici sau grup-specifici cu subclasificare consecutivă în funcție de greutatea moleculară în liganzi cu greutate moleculară mică şi liganzi macromoleculari.

8.3.1. Liganzi monospecifici

Liganzii monospecifici cum ar fi substraturile, hormonii sau anticorpii leagă cu înaltă specificitate structurile complementare cum ar fi enzime, receptori, proteine carrier sau antigene, astfel încât este legată în complex doar una sau un număr mic de proteine ale unui tip particular de extract celular sau fluid fiziologic. Astfel, pentru fiecare proteină dată este necesară o matrice de afinitate unică. De exemplu, vitamina B_{12} se leagă doar de factorul intrinsec din sucul gastric sau de transcobalamina II plasmatică. Anticorpii sunt liganzi macromoleculari monospecifici foarte utili în cromatografia de afinitate, în special când trebuie purificat un compus fără un situs de legare direct. Ei pot fi folosiți pentru a izola aproape orice, de la peptide până la celule întregi. Ca rezultat al tehnologiei moderne a hibridomului, anticorpii monoclonali au înlocuit masiv anticorpii policlonali. În principiu, această tehnologie asigură şi o sursă constantă de anticorpi uniformi cu reproductibilitate ridicată de la o serie de producție la alta. Ca avantaje menționăm afinitatea de legare ridicată, de cele mai multe ori de cel puțin 10 ori mai mare decât a anticorpilor policlonali, rezultând factori de purificare de câteva mii într-o singură etapă. Dezavantajele sunt reprezentate de costurile ridicate şi susceptibilitatea la degradare proteolitică. În consecință nu ar trebui aplicate extracte neprelucrate/brute direct pe coloanele de afinitate bazate pe anticorpi monoclonali.

În general, liganzii nonspecifici se leagă mai intens şi necesită condiţii de eluţie mai severe decât în cazul liganzilor cu specificitate de grup ale căror complexe pot fi de obicei disociate în condiţii blânde. Un exemplu de legare extrem de strânsă este complexul avidină-biotină cu constantă de disociere K_A de 10^{15}.

8.3.2. Liganzi cu specificitate de grup

Liganzii cu specificitate de grup sunt compuşi care leagă o clasă sau o familie de proteine înrudite. Cel mai mare grup de liganzi aplicaţi în mod curent sunt liganzii cu greutate moleculară mică cu ar fi cofactori enzimatici şi analogi enzimatici (tabelul 8.2). aceştia pot fi de origine biologică sau non-biologică.

Pentru purificarea dehidrogenazelor şi kinazelor NAD^+- şi $NADP^+$- dependente sau folosit în special nucleotide adeninice sau analogi precum 5'-AMP şi solvenţii triazinici Cibacron Blue F3G-A and Procion Red HE-3B, dar acestea sunt legate şi de alte proteine precum albumina sau interferoni. În ciuda specificităţii relativ largi, s-au obţinut randamente de purificare ridicate folosindu-se protocoale de eluţie specifice sau prin valorificarea formării de complexe terţiare pe bază de cofactori sau substraturi.

Tab. 8.2 Exemple de liganzi cu specificitate de grup

Ligand	***Exemple de molecule legate***
Liganzi cu greutate moleculară mică	
5'-AMP	dehidrogenaze NAD^+- dependente, kinaze ATP- şi cAMP – dependente
Cibacron Blue F3G-A	dehidrogenaze NAD^+- dependente, proteine de legare a acizilor nucleici, albumina, interferon, α_2-macroglobulina, factori procoagulanţi
Procion Red HE-3B	enzime $NADP^+$- dependente, aldehid-reductaza, dihidrofolat-reductaza, carboxi-peptidaza G, interferon, plasminogen şi activatorul plasminogenului
Benzamidina	tripsina, trombina, factorul X_a al coagulării
Arginina	proteaze serice, factori procoagulanţi, plasminogen şi activatorul plasminogenului
Lizina	ARNr, plasminogen şi activatorul plasminogenului

Liganzi macromoleculari	
Heparina	factorii VII, IX, XI, XII, XII_a ai coagulării, trombina, antitrombina III, factorii complement, lipaze, lipoproteine, ARN şi ADN polimeraze, receptori steroizi, antigenul de suprafață al virusului B hepatic, interferon
Calmodulina	ATP-aze, protein-kinaze, fosfodiesteraze, neurotransmițători, interferon
Lectine	glicoproteine, proteine de membrană, glicolipide, lipoproteine, polizaharide, hormoni, α_1-antitripsina, interferon
Proteina A	anticorpi policlonali şi monoclonali
Proteina G	anticorpi policlonali şi monoclonali

Liganzii cu specificitate de grup includ lectine, heparina şi proteinele bacteriene A şi G (tabelul 8.2). Lectinele interacționează cu glucidele care le conferă proprietăți deosebite de purificare a glicoproteinelor solubile sau membranare precum hormonii, proteinele plasmatice, antigenele, anticorpii sau antigenele de grup sanguin. Pot fi legate chiar celule sau organite celulare. Lectinele diferă în raport de specificitatea față de glucide în funcție de sursa lectinelor. Concanavalina A şi lectina din linte (*Lens culinaris*) leagă α-D-manoza şi β-D-glucoza comune şi reziduurile înrudite stereoizomeric. Cele două lectine diferă în ceea ce priveşte puterea lor de legare, concanavalina A formând în cele mai multe cazuri complexele cele mai stabile. Glicoproteinele care conțin un număr mare de grupări N-acetilglucozamină, precum α_2-macroglobulina, glicoproteinele α_2-acide sau mucinele pot fi purificate folosind lectina din germeni de grâu. Heparina polizaharid-sulfatată este folosită frecvent pentru izolarea factorilor de coagulare plasmatici şi alte proteine plasmatice, dar şi pentru purificarea enzimelor precum endonucleazele sau ARN şi ADN polimerazele şi receptorii steroizi. Proteinele bacteriene A şi G sunt cel mai mult folosite în etapele de purificare ale anticorpilor. Ambele proteine diferă în ceea ce priveşte specificitatea lor față de clasele de imunoglobuline provenite de la om sau care au sursă animală. Proteina G este o proteină de suprafață celulară provenită de la streptococi de grup G, în timp ce proteina A este izolată din *Staphylococcus aureus*. Este utilizată şi proteina A recombinată.

8.3.3. Obținerea ligandului

Deşi prezintă selectivitate înaltă, liganzii de provenienţă naturală au adesea un potenţial restrâns datorită disponibilităţii limitate. Prin dezvoltarea chimiei şi biologiei, asociată adesea cu tehnici de modelare computerizată, spectroscopie cu raze-X şi rezonanţă magnetică nucleară, apare o nouă oportunitate de a obţine liganzi de afinitate non-naturali, înalt specifici.

Tehnologiile „phage-display" permit identificarea liganzilor peptidici pentru o moleculă ţintă dată dintr-o imensă bancă de peptide diferite exprimate pe suprafaţa bacteriofagilor. Prezentarea băncii de peptide pe suprafaţa bacteriofagilor („phage display") ca pe o fuziune de peptide şi o proteină de înveliş fagică permite legarea fizică între peptidul prezentat şi secvenţa ADN ce codifică pentru secvenţa de aminoacizi a acestuia. Varietatea de peptide/proteine poate fi introdusă prin mutageneza combinativă a genei de fuziune. Pot fi creaţi, replicaţi, selectaţi şi amplificaţi un număr extrem de mare de fagi printr-un proces numit „biopanning". Băncile sunt incubate cu o moleculă ţintă, fie ca ţintă imobilizată, fie înaintea captării complexului pe un suport solid. Ca şi în cromatografia de afinitate, peptidele şi proteinele ce nu interacţionează sunt „spălate" şi îndepărtate, urmând ca ulterior moleculele ce au interacţionat să fie eluate.

Peptidele sau proteinele ce interacţionează prin phage-display pot fi amplificate prin infecţie bacteriană, pentru a le creşte numărul de copii. Procesul de selecţie/amplificare poate fi repetat pentru a îmbogăţi în continuare acei membrii ai băncii cu afinitate relativ mai crescută faţă de ţintă. Rezultatul este o populaţie finală de peptide ce este dominată de secvenţe care leagă ţintele cel mai bine. Un ligand identificat în acest fel poate fi ulterior imobilizat pe un suport şi aplicat pentru izolarea unei molecule ţintă dintr-o probă. Prin această abordare, liganzii derivaţi din domeniul proteinei A au fost selectaţi pentru bănci combinative prin phage-display şi utilizaţi pentru izolarea prin cromatografie de afinitate de imunoglobuline A plasmatice de origine umană [Rönnmark şi colab., 2002], anticorpi monoclonali umanizaţi [Ehrlich , Bailon, 2001] şi factor VIII de coagulare de origine umană recombinat [Nord şi colab., 2001].

O abordare similară cu „phage-display” pentru peptide, valorifică băncile de oligonucleotide ce permit identificarea anumitor secvențe nucleotidice, cunoscute ca aptameri, care se leagă cu înaltă afinitate şi specificitate de o moleculă țintă dorită. Înalta afinitate a aptamerilor este atribuită capacității lor de a „încorpora” molecule în structura lor şi de a se integra în structura moleculelor mari precum peptidele. În timp ce în soluții sunt deseori astructurați, aptamerii se pliază la legarea moleculei lor țintă. Secvențele nucleotidice sunt identificate printr-un proces denumit evoluție sistematică a liganzilor prin îmbogățire exponențială (SELEX). Secvențele de legare sunt izolate din băncile aleatorii folosind o colană de afinitate cu molecula țintă dorită şi ulterior amplificate prin reacția de polimerizare în lanț (PCR). Acestea sunt urmate de alte câteva tratamente ciclice similare. Rezultatul este o populație de oligonucleotide în care predomină secvențele care leagă cel mai bine ținta. Un ADN-aptamer specific L-selectinei umane a fost utilizată efectiv pentru purificarea unei proteine de fuziune imunoglobulină – L-selectină umană recombinată din mediu de condiționare pentru celule ovariene de hamster chinezesc.

Pentru purificarea la scară redusă în laborator sau ca liganzi „de deschidere”, liganzii de origine biologică prezintă câteva neajunsuri în cazul aplicării lor la scară largă. Astfel, aceştia necesită şi ei înşişi purificare, putând fi contaminați cu ADN-ul gazdei sau virusuri şi prezintă variabilitate de la lot la lot. În plus, procedeele de sterilizare pot determina degradarea, iar instabilitatea ligandului poate cauza contaminarea produsului final cu produşi de extracție potențial toxici sau imunogeni. Pe de altă parte, liganzii sintetici sunt compuşi bine definiți care pot fi preparați pe scară largă fără probleme. Chimia combinatorie (combinatorial chemistry) în combinație cu tehnicile de modelare computerizată şi spectroscopia prin raze-X sau prin rezonanță magnetică nucleară au condus către conceperea şi obținerea de noi liganzi.

Screening-ul unei bănci de peptide de sinteză combinatorie a avut rezultat obținerea de tri- şi tetrapeptide dimerice şi tetramerice care s-au dovedit a fi liganzi utili pentru izolarea imunoglobulinelor şi anticorpilor monoclonali [Fassina şi colab., 2001]. Un exemplu este utilizarea „phage display” pentru identificarea unui ligand

„de deschidere” urmată de optimizarea prin sinteză peptidică în fază solidă asociată cu modelarea moleculară care a dus la obținerea unei pentapeptide ca şi ligand pentru regiunea de legare a unui anticorp monoclonal îndreptat împotriva unui steroid. Peptidul imobilizat a fost ulterior utilizat pentru purificarea anticorpului [Murray şi colab., 2001].

Conceperea *de novo* a liganzilor de afinitate a fost de asemenea obținută prin recuperarea informației structurale a proteinei țintă din rezultatele cristalografiei cu raze-X, RMN sau omologe, şi identificarea situsurilor de legare adecvate fie ca situsuri active, un situs implicat în legarea ligandului natural, fie ca o regiune sau un domeniu pe suprafața proteinei. Până acum au fost realizate trei abordări [Lowe şi colab., 2001]: (1) investigarea structurii interacțiunilor normale proteină – ligand ca şablon pe baza căruia este modelat un ligand biomimetic, (2) modelarea unui ligand complementar resturilor aminoacizilor expuşi la nivelul situsului țintă şi (3) imitarea directă a interacțiunilor naturale de recunoaştere biologică. Exemple de utilizare a chimiei combinatorii pot fi modelarea de novo a liganzilor pe structura de bază a triazinei. Acest mod de abordare pe bază de şablon a fost utilizat pentru obținerea liganzilor de afinitate modelați pe proteina A pentru izolarea şi purificarea imunoglobulinei G umane. Modelarea prin complementaritate a fost aplicată la obținerea unui ligand pentru un precursor recombinat al insulinei iar imitarea interacțiunilor biologice s-a realizat prin obținerea unei lectine artificiale ca adsorbant de afinitate pentru glicoproteine. O parte din aceste medii de afinitate au fost comercializate.

8.4. Matricea de afinitate

8.4.1. Materialul de suport

Suportul solid de susținere a ligandului în coloană controlează numeroşi factori cum ar fi proprietățile chimice de imobilizare şi caracteristicile fluxului. Un material ideal trebuie să îndeplinească câteva criterii:

- suportul trebuie să prezinte macroporozități pentru a permite interacțiunea liberă cu molecule mari;

- suportul trebuie să fie neutru şi hidrofil pentru a fi preîntâmpinate interacţiunile nespecifice cu matricea;
- suportul trebuie să conţină grupări funcţionale adecvate pentru ataşarea liganzilor prin obţinerea derivaţilor cu acesta, prin intermediul unei mari varietăţi de reacţii chimice;
- suportul trebuie să fie chimic stabil în condiţiile adesea severe în cursul obţinerii derivaţilor şi regenerării (inclusiv sterilizării) coloanei;
- suportul trebuie să fie fizic stabil sub presiunea hidrodinamică din cursul cromatografiei;
- suportul trebuie să fie uşor disponibil cu costuri reduse.

Matricele de provenienţă naturală se bazează pe polizaharide ce formează spontan geluri care îndeplinesc majoritatea condiţiilor de mai sus. Agaroza, un polizaharid cu structură liniară compus din molecule alternante de D-galactoză cu legături în poziţiile 1, 3 şi 3,6-anhidro-L-galactoză cu legături în poziţiile 2, 4, a fost menţionată prima oară în 1968 şi este încă cel mai utilizat suport datorită proprietăţilor deosebite ale gelului şi pentru că este relativ inertă biologic.

Principalul inconvenient al agarozei native este instabilitatea sa chimică şi fizică, dar a fost în cea mai mare parte depăşit prin crearea de legături chimice încrucişate. Alte material de suport includ celuloza, dextrani cu legături chimice încrucişate, poliacrilamida, tris(hidroximetil)acrilamida polimerizată (trisacril), geluri hidroxialkil metacrilat, vinildimetil azlacton-N,N'-metilen-bis(acrilamid) copolimeri, derivaţi ai polistirenului precum şi derivaţi ai gelului de siliciu , perle de sticlă şi ceramice poroase. Mai sunt folosite şi copolimeri micşti agaroză-acrilamidă şi dextran-acrilamidă.

În funcţie de suport, cromatografia de afinitate se poate subclasifica în tehnică de joasă performanţă şi tehnică de înaltă performanţă. Cromatografia de afinitate de joasă performanţă utilizează geluri nonrigide cu particule de dimensiuni mari. În această categorie intră majoritatea materialelor pe bază de carbohidraţi şi polimeri. Datorită presiunilor de împingere relativ mici coloana poate funcţiona chiar şi la un flux generat gravitaţional sau folosind pompe peristaltice.

În cromatografia de afinitate de înaltă performanță suportul este constituit de un material rigid cum ar fi derivați ai gelului de siliciu, sticlă poroasă, polistiren hidroxilat sau perle de agaroză cu legături chimice încrucişate dense cu dimensiune mică a particulelor care rezistă presiunilor mari aplicate în condiții standard în cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC). Această tehnică este utilizată în special pentru aplicații analitice.

8.4.2. Imobilizarea ligandului

Materialele de suport diferă şi în funcție de metodele disponibile de obținere a derivaților. Majoritatea metodelor de imobilizare a liganzilor s-au axat pe valorificarea grupărilor hidroxil prezente în suporturile pe bază de carbohidrați. Unul din avantajele agarozei este faptul că îşi menține structura microporoasă în solvenții organici. Cum majoritatea reacțiilor organice sunt efectuate în medii organice, aceste reacții pot fi aplicate şi agarozei. Acesta poate fi un alt motiv al utilizării frecvente a acestui material.

Reacțiile de imobilizare sunt determinate de grupări funcționale prezente în suportul solid şi în ligand, ca şi de condițiile de reacție tolerate de către suport şi ligand. O proteină necesită în general condiții de reacție mai blânde decât o moleculă organică mică. În majoritatea cazurilor, procedeul este constituit din trei etape:

- activarea suportului pentru a crea grupări funcționale reactive;
- cuplarea ligandului ;şi
- dezactivarea grupărilor reactive reziduale ale suportului printr-un exces de compus cu greutate moleculară mică.

În tabelul 8.3 sunt exemplificate metodele uzuale de imobilizare utilizate în cromatografia de afinitate. În cele mai multe cazuri este introdusă în matrice o grupare electrofilică, care va reacționa cu grupările nucleofilice ale ligandului, precum grupările amino, tiol sau hidroxil.

Cuplarea prin grupări electrofilice ale ligandului şi grupări nucleofilice ale matricei este mai rar pusă în practică. Se poate efectua oxidarea diolilor cu periodat de potasiu pentru obținerea unei aldehide înaintea imobilizării ligandului.

Tabelul 8.3 Metode de imobilizare în cromatografia de afinitate

Grupare funcțională	*Substanță imobilizată*
Amino	Bromură de cian (CNBr)
	Carbonil diimidazol (CDI)
	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC)
	Esterii N-hidroxi succimidei
	Introducerea grupărilor amino- prin reacții de reducere (de ex. reducerea nitroderivaților)
	Activare epoxi sau bioxiran
	Clorură de tosil
	Clorură de tresil
	Divinilsulfonă
	2-fluoro-1-metilpirimidin toluen-4-sulfonat (FMP)
	Activarea azlactonei
	Clorură cianurică
Hidroxil	Carbonil diimidazol (CDI)
	Activare epoxi sau bioxiran
	Divinilsulfonă
	Clorură cianurică
Tiol	Iodoacetil
	Bromoacetil
	Maleimid
	Piridil disulfat
	Activare epoxi sau boxiran
	Divinilsulfonă
	2-fluoro-1-metilpiridină toluen-4-sulfonat (FMP)
	Acid 5-tio-2-nitrobenzoic (TNB) –tiol
Aldehidă	Metoda hidrazidei
	Introducerea grupărilor amino- prin reacții de reducere
Carboxil	Carbonil diimidazol (CDI)
	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC)
Hidrogen activ (CH)	Sinteza diazo
	Condensarea Mannich

Reacțiile puse în practică depind de suportul folosit, gelul de siliciu şi perlele de sticlă necesitând introducerea grupărilor adecvate înainte de a se putea efectua cuplarea. Pentru a evita reacțiile cu componentele probei, poate fi necesară blocarea grupărilor active ce rămân după ataşarea ligandului. În plus, grupările de blocare nu ar trebui să prezinte proprietăți de legare nespecifică.

Sunt deseori folosite molecule mici precum aminoetanol, mercaptoetanol, mercaptoetilamina sau tris(hidroximetil)aminometan. Numeroşi producători pun la dispoziție multe suporturi activate şi de asemenea informații detaliate asupra procedurilor de cuplare. Alegerea substanței chimice pentru imobilizare joacă un rol important pentru funcționarea finală a coloanei de afinitate. Condiții de reacție improprii sau nespecifice pot afecta reactivitatea sau o varietate de posibile orientări ale ligandului pe gel. Aşa numita ataşare multi-situs se referă la legarea pe mai mult de o grupare reactivă a ligandului. Deşi prin aceasta se obține o legare mult mai stabilă decât cea pentru un singur situs, ataşarea pe mai multe situsuri poate determina distorsiunea sau denaturarea situsului activ al liganzilor proteinei. Orientarea aleatorie se referă la ataşarea de grupările funcționale localizate la nivelul unor situsuri variabile ale ligandului. Deşi o anumită cantitate de ligand este ataşat în poziția adecvată, o parte poate fi ataşat eronat, afectând reactivitatea sau blocând situsul activ. Per ansamblu, la aceste materiale se observă o activitate scăzută a ligandului.

Chiar şi când se păstrează orientarea adecvată, afectarea sterică a reactivității poate avea loc şi atunci când ligandul este ataşat prea aproape de suprafața suportului sau de alți liganzi. Fenomenul de afectare sterică a reactivității prin molecule de vecinătate poate fi redus prin scăderea gradului de acoperire a ligandului cu ajutorul unui distanțator („spacer”) ce măreşte distanța dintre suport şi ligand. Sunt disponibile diverse molecule şi substanțe distanțatoare. Molecula distanțator poate fi ataşată inițial pe suport urmată de cuplarea ligandului sau aceasta poate fi încorporată în ligand cu imobilizarea consecutivă pe matrice. Molecula distanțator nu ar trebui să intervină prin interacțiuni nespecifice cu nici una din componentele probei. Molecule distanțator frecvent utilizate în cromatografia de afinitate sunt acidul 6-

aminocapronic, diaminodipropilamina, 1,6-diaminohexan, etilendiamina, acidul succinic, glutaraldehida şi epoxizii aminați.

Ataşarea liganzilor pe suport ar trebui realizată print-o legătură chimică cât mai stabilă posibil, pentru prevenirea pierderii ligandului în timpul operării coloanei. Totuşi, în anumite circumstanțe poate fi utilă ataşarea ligandului printr-o legătură chimică ce poate fi clivată dacă este necesar. Un exemplu este legătura disulfidică ce se poate forma şi cliva în condiții blânde prin reacții de schimbare tiol-disulfid.

Conceperea unui mediu de activitate presupune trei paşi cheie: (1) selecția matricei, (2) selecția ligandului şi (dacă este necesar) a moleculei distanțator, şi (3) alegerea metodei de cuplare. Din literatură sau de la producători sunt disponibile multe protocoale standardizate; totuşi, în special pentru liganzii noi, trebuiesc studiate metode special concepute, pentru a asigura în final o bună capacitate de legare a coloanei. Câțiva distribuitori pun la dispoziție şi matrice de afinitate ce conțin diferiți liganzii cu specificitate de grup.

O nouă strategie de imobilizare este oferită de fazele staționare monolitice caracterizate prin viteze crescute de transfer a masei. În acest caz un ligand este conjugat cu unul din monomerii unui amestec de polimeri. Polimerizarea *in situ* are ca rezultat un monolit de afinitate cu o structură poroasă, prezentatoare de liganzi definiți.

8.5. Principii de operare

Condițiile de legare şi eluție pentru o substanță analizată dată depind de natura interacțiunilor dintre ligand şi molecula țintă. Afinitatea prea scăzută va determina producții scăzute, iar substanța analizată fiind antrenată prin coloană se pierde. O legare prea puternică poate duce la producții scăzute printr-o eluție insuficientă. Metodele de preparare a probei premergătoare aplicării probei pe coloană ar trebui să asigure legarea moleculei țintă. De asemenea, coloana trebuie să fie echilibrată cu substanța tampon de legare înaintea utilizării. Când se lucrează cu interacțiuni slabe ce ating lent starea de echilibru, trebuie reglat un flux lent față de interacțiunile de afinitate ce ating rapid echilibrul. Deoarece cromatografia de afinitate este o tehnică

ce implică legături chimice, volumul probei nu afectează separarea atâta timp cât condițiile experimentale asigură o legare suficient de solidă între ligand şi substanța de analizat.

După ce tot materialul nedorit este îndepărtat („spălat”) de pe coloană, se poate face eluția compuşilor legați. Nu există o schemă general aplicabilă tuturor mediilor de afinitate. Complexele ligand – substanță de analizat sunt menținute printr-o combinație de interacțiuni electrostatice şi de tip hidrofob atâta timp cât hidrogenul menține legăturile. Condițiile care slăbesc aceste interacțiuni determină detaşarea compuşilor legați. În plus, stabilitatea ligandului şi a moleculelor țintă trebuie să fie tratate cu atenție, mai ales în cazul proteinelor. Adesea trebuie făcut un compromis între condițiile severe necesare pentru o bună eluție şi riscul denaturării proteinelor.

Condițiile de eluție în cromatografia de afinitate pot fi clasificate în selective şi neselective. Condițiile selective sunt folosite în cazul interacțiunilor cu specificitate de grup. În aceste cazuri substanța tampon conține compuşi care competiționează fie pentru legarea de ligandul de afinitate în coloană, fie pentru legarea de molecula țintă. Eluția selectivă este deseori efectuată în esență sub aceleaşi condiții de solubilizare ca şi cele folosite pentru probă. Condițiile de eluție neselective sunt în mod frecvent aplicate pentru interacțiuni cu înaltă specificitate. Acestea includ modificări ale pH-ului, tăria ionică sau polaritatea soluției tampon pentru eluție. pH-ul determină gradul de ionizare sau de încărcare a grupărilor ligandului şi/sau substanței de analizat legate astfel că o modificare a pH-ului influențează direct situsurile de legare prin scăderea afinității sau modificarea conformațională. O scădere abruptă a pH-ului soluției tampon este metoda de eluție a materialelor puternic legate cea mai frecvent folosită. Stabilitatea chimică a proteinei şi a matricei de afinitate limitează utilizarea în acest sens a pH-ului. O creştere a tăriei ionice a tamponului va determina eluția proteinelor care sunt legate predominant prin interacțiuni de tip electrostatic. Aceasta este o tehnică blândă de desorbție, în special pentru enzime, 1M NaCl fiind de obicei suficient. Diverse proteine pot de asemenea să fie dizolvate prin gradiente continui sau discontinui. Reducerea polarității poate fi obținută prin adăugarea dioxanului sau etilenglicolului în eluent. În cazul legăturilor strânse dominate de interacțiuni de tip

hidrofob, eluția poate fi obținută prin utilizarea aşa numiților agenți chaotropi care denaturează structura proteinelor, cum ar fi ureea, guanidină hidroclorat sau detergenții. Totuşi acestea sunt condiții drastice care pot cu mare probabilitate să denatureze proteinele. Adesea pe toată durata procesului de purificare atunci când sunt manipulate proteine membranare sau în cursul purificării anticorpilor, sunt folosite concentrații scăzute de detergenți pentru a se inhiba adsorbția sau agregarea de tip hidrofob nespecifică. Se pot aplica şi combinații de condiții selective şi neselective.

Reutilizarea adsorbanților de afinitate depinde de natura probei ca şi de stabilitatea ligandului şi a matricei, ținându-se cont de condițiile de eluție şi curățare. De regulă este necesară reechilibrarea atentă a coloanei înainte de folosire. În plus, suporturile pe bază de carbohidrați şi liganzii proteici sunt predispuse la degradare microbiană şi poate avea loc şi contaminarea coloanei cu resturi celulare degradate, lipide şi proteine. Acestea trebuie îndepărtate complet. În plus poate fi necesară decontaminarea pentru îndepărtarea bacteriilor, virusurilor şi piogenilor, dar astfel de condiții severe ar putea să nu fie aplicabile liganzilor proteici, de exemplu. Este recomandată depozitarea coloanelor la temperaturi mici.

8.6. Modele de cromatografie de afinitate

Spectrul larg al interacțiunilor de afinitate a generat o mare varietate de tehnici speciale ce poartă fiecare propria nomenclatură (tabelul 8.4). Dintre acestea nu toate se bazează pe specificitatea unică între ligand şi molecula țintă, ci mai degrabă pe fenomene mai generale; altele se referă la aplicații specifice. Principalele modele vor fi discutate pe scurt.

8.6.1. Cromatografia de bioafinitate

Cromatografia de bioafinitate sau cromatografia de afinitate prin bioadsorbție reprezintă tehnica prin care o moleculă de origine biologică este folosită ca ligand de afinitate. Aceasta a fost primul tip de cromatografie de afinitate şi reprezintă categoria de tehnici cea mai diversă.

Câțiva dintre liganzi sunt prezentați în tabelele 8.1 şi 8.2, iar în literatură au fost descrişi mulți alții. Aceştia includ molecule mici precum aminoacizi, peptide, carbohidrați, cofactori, substraturi şi inhibitori nucleotidici, precum şi molecule mari cum ar fi proteine, polizaharide şi acizi nucleici.

Unele forme ce utilizează un anumit tip de interacțiune sunt recunoscute ca metodă de sine stătătoare, ca de exemplu cromatografia de afinitate a lectinei, care se bazează pe interacțiunea dintre lectine şi carbohidrați şi cromatografia de afinitate avidină-biotină ce utilizează legarea de înaltă specificitate a biotinei de avidină.

Tabelul 8.4 Tipuri de cromatografie de afinitate şi tehnici asociate

Cromatografia de bioafinitate
Cromatografia de imunoafinitate
Cromatografia de afinitate pentru lectină
Cromatografia de afinitate avidină – biotină
Cromatografia de afinitate ligand – colorant
Cromatografia de afinitate prin ioni metalici imobilizați
Cromatografia prin interacțiuni hidrofobe
Cromatografia tiofilică
Cromatografia prin inducție de încărcare hidrofobă
Cromatografia prin afinitate de covalență
Cromatografia de afinitate joasă
Cromatografia prin afinitate de receptor
Cromatografia prin afinitate – respingere
Cromatografia prin afinitate de perfuzie
Cromatografia prin afinitate de centrifugare
Cromatografia prin amprentare moleculară (molecular imprinting)
Cromatografia prin afinitate de membrană
Partiția de afinitate
Precipitarea de afinitate
Cromatografia prin afinitate de înaltă performanță
Electroforeza de afinitate
Electroforeza de afinitate capilară

8.6.2. Cromatografia de imunoafinitate

Cromatografia de imunoafinitate poate fi privită ca o subcategorie de cromatografie de bioafinitate din moment ce ligandul ,un anticorp, are de regulă origine biologică. Uneori sunt denumite în acest fel metodele de imobilizare a antigenelor pentru purificarea anticorpilor. În funcție de natura antigenului, ligandul poate fi sau nu de origine biologică. Înalta selectivitate a interacțiunilor antigen-anticorp şi posibilitatea de producere a anticorpilor îndreptați împotriva unei mari varietăți de substanțe solubile au transformat cromatografia de imunoafinitate într-un instrument foarte util de purificare şi analiză a compuşilor. Se pot exemplifica astfel medicamente, hormoni, peptide, enzime, proteine recombinate, anticorpi, receptori, organite celulare, celule şi virusuri. În plus față de folosirea ca tehnică de sinteză, utilizarea în scopuri analitice a cromatografiei de imunoafinitate devine din ce în ce mai atractivă.

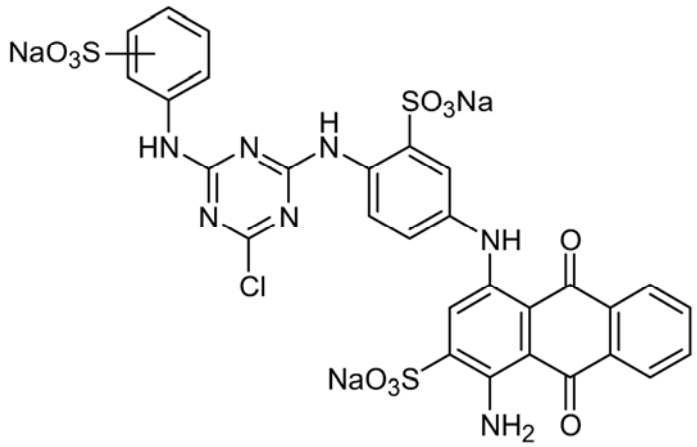


Fig. 8.2 Structura Cibacron Blue F3G-A

8.6.3. Cromatografia de afinitate ligand-colorant

Cromatografia de afinitate ligand-colorant utilizează drept liganzi coloranți textili reactivi pe bază de triazinil. În timp ce mulți liganzi de afinitate naturali sunt scumpi datorită costurilor mari de producție şi purificare, disponibili în cantități limitate şi au şi alte inconveniente, coloranți sintetici pot fi obținuți în cantități mari la un preț scăzut dând posibilitatea întocmirii facile a unei colane de afinitate. În plus, aceşti compuşi prezintă o stabilitate chimică şi biologică excelentă. Cibacron Blue

F3G-A (fig. 8.2) a fost primul ligand de afinitate utilizat, iar de atunci s-au folosit mulți compuşi derivați ai coloranților. Coloranții sunt imobilizați pe suport prin intermediul ionilor de clor reactivi pe jumătate, triazina heterociclică. În multe studii cinetice s-a demonstrat că trazinil–coloranții interacționează cu situsurile de legare a liganzilor nucleozidici NAD^+, NADH, $NADP^+$, NADPH, ATP sau GTP. Până în momentul de față prin cromatografia de afinitate ligand–colorant s-au izolat molecule precum enzime (kinaze, dehidrogenaze, endonucleaze, hidroxilaze, fosfodiesteraze şi multe altele), factori ai coagulării, interferoni şi albumină serică.

Deşi coloranții textili pot interacționa cu o remarcabilă specificitate cu proteine, în unele cazuri interacțiunile acestora cu un număr mare de proteine aparent neînrudite compromit inevitabil specificitatea lor de legare ceea ce le conferă dezavantaje majore. Preocuparea în ceea ce priveşte puritatea, toxicitatea şi scăpările în produsul final a coloranților comerciali le-a limitat utilizarea în domeniul biofarmaceutic. Tehnicile raționale de proiectare moleculară incluzând cristalografia cu Raze X, modelarea moleculară şi chimia combinatorie au dus la obținerea de „coloranți – liganzi biomimetici” cu înaltă specificitate pentru o proteină dată, păstrând şi majoritatea avantajelor coloranților comerciali.

8.6.4. Cromatografia de afinitate prin ioni metalici imobilizați (IMAC)

În IMAC sau cromatografia de afinitate prin chelare metalică, o tehnică introdusă în 1975, un ion metalic este complexat cu un agent chelator imobilizat. Ionul metalic formează legături coordinative cu aminoacizi cu grupări donor de electroni precum histidina, triptofanul sau cisteina. În timp ce interacțiunile dintre ionii metalici şi catenele laterale ale aminoacidului sunt uşor reversibile, acestea pot fi utilizate pentru adsorbție şi ulterior pot fi desfăcute în condiții blânde fără denaturare. Chelatorii utilizați în mod obişnuit includ acidul iminodiacetic, acidul nitrilotriacetic, acid carboximetilat aspartic sau N,N,N'-tris(carboximetil) - etilendiamină. Selectivitatea în IMAC este determinată de ionii metalici care pot fi împărțiți pe baza reactivităților preferențiale față de nucleofile în ioni tari, intermediari şi slabi. Ionii metalici tari sunt Fe^{3+}, Al^{3+}, Ca^{2+}, care manifestă afinitate

față de oxigen. Ionii metalici slabi cum sunt Cu^{+}, Hg^{2+} sau Ag^{+} au afinitate față de sulf, în timp ce ionii intermediari Cu^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+} şi Co^{2+}, formează legături coordinative cu azotul, oxigenul şi sulful.

În ciuda faptului că multe resturi de aminoacizi cu perechi libere de electroni pot participa la formarea legăturilor, în practica IMAC retenția proteică se bazează în principal pe disponibilitatea resturilor histidil de la suprafața proteinelor. Ionii metalici intermediari utilizați de obicei pot fi ordonați după creşterea specificității: $Cu^{2+} < Ni^{2+} < Zn^{2+} \leq Co^{2+}$. Astfel, Cu^{2+} va reține mai multe proteine iar numărul va scădea în cazul Ni^{2+}, Zn^{2+} şi Co^{2+} datorită afinității mai scăzute pentru situsurile de legare. Dintre proteinele care au fost purificate prin IMAC cu ajutorul resturilor expuse ale histidinei sunt proteinele serice umane, interferonul, lactoferina şi activatorul tisular al plasminogenului. Afinitatea pentru resturile histidinice a dus la sinteza moleculelor de afinitate terminate în histidină pentru proteine şi peptide recombinate. Aceste terminații conțin multiple histidine legate la capătul C sau N terminal. După ce au fost evaluate câteva terminații formate din 1 până la 8 peptide repetitive ce conțin histidină, astăzi de departe cele mai folosite terminații histidinice sunt formate din 6 resturi consecutive de histidină, care sunt comercial cunoscute sub diverse denumiri. Terminațiile histidinice par a fi compatibile cu toate sistemele de expresie folosite astăzi astfel încât proteinele cu terminații histidinice pot fi produse cu succes în celule procariote şi eucariote, intracelular sau ca proteine secretate.

Ca tehnică mai degrabă nespecifică de purificare a proteinelor, IMAC este în prezent una dintre cele mai utilizate metode pentru izolarea proteinelor recombinate . S-a estimat că peste 50% din proteinele recombinate exprimate la celulele gazdă procariote sunt purificate prin IMAC. De obicei, prelungirile polihistidinice nu compromit funcționalitatea biologică a unei proteine şi nu au imunogenitate importantă. Totuşi, mai ales în cazul proteinelor implicate în terapie, clivarea terminației ar putea fi necesară, nefiind întotdeauna uşor de realizat. În general clivarea enzimatică este aplicabilă în purificarea amestecului rezultat din proteina de fuziune clivată, enzimă, proteina neclivată şi alții produşi de clivare. În plus, trebuie luată în considerare toxicitatea ionilor metalici ce scapă din coloana IMAC. Mai mult,

ionii metalici de multe ori catalizează reacții de oxidare ce pot duce la degradarea oxidativă a proteinelor. Cei mai predispuşi la reacții de oxidare sunt în special aminoacizii cisteina şi metionina ce conțin sulf.

8.6.5. Cromatografia prin interacțiuni hidrofobe (HIC)

HIC se bazează pe asocierea grupărilor hidrofobe pe suprafața proteinelor cu liganzi mobilizați prin legături de tip hidrofob slabe pe suporturi cromatografice. HIC este efectuată în soluții apoase, fapt ce o diferențiază de tehnica de cromatografie cu fază inversă, unde sunt folosiți solvenți organici pentru eluția proteinelor. În plus densitatea ligandului în cromatografia cu fază inversă este mai mare, astfel că faza staționară poate fi privită ca o fază continuă, în timp ce în HIC liganzii interacționează individual cu moleculele țintă. Liganzi folosiți uzual sunt resturi butil, octil sau fenil adesea legați prin intermediul unui eter glicidil. Sunt folosiți ca liganzi şi oligoetilenglicol şi hidroxipropil.

Retenția substanței dizolvate este controlată de tipul şi concentrația sării utilizate şi a aditivilor organici care schimbă polaritatea solventului. Adăugarea de etilen glicol în soluția tampon modifică structura de ansamblu a apei în sensul unei structuri ce se aseamănă unei faze organice, scăzând astfel interacțiunea dintre proteină şi liganzi. Influența sărurilor asupra legării poate fi corelată cu poziția sării în seria Hoffmeister, clasificând anionii şi cationii în liotropici sau chaotropici. Sărurile liotropice cum sunt sulfatul de amoniu sau fosfatul de potasiu vor scădea solubilitatea apei în proteine crescând astfel retenția lor în HIC; sărurile chaotropice vor determina desorbția proteinelor. În practică desorbția proteinelor va fi realizată prin scăderea concentrației saline. Alegerea corectă a sării este un factor important ce determină specificitatea separărilor. După încărcarea probei în coloană folosind o soluție tampon cu o concentrație a sării suficient de mare pentru a determina legarea proteinei țintă dar suficient de scăzută pentru a evita precipitarea proteinei, componentele nelegate din probă sunt spălate şi eliminate din coloană. Ulterior concentrația de sare este scăzută în trepte sau continuu sub forma unui gradient pentru a se realiza eluția selectivă a proteinei de interes. Alți factori care trebuiesc

controlați pentru obținerea rezultatelor reproductibile includ pH-ul, temperatura şi aditivii ce influențează stabilitatea proteinei. În general, HIC este o metodă de separare blândă datorită acțiunii stabilizatoare a sărurilor iar rata de recuperare este adesea ridicată.

Cromatografia prin interacțiuni tiofilice poate fi considerată o metodă din aceeaşi categorie cu HIC. Matricea poartă liganzi liniari ce conțin atomi de sulf. Inițial structurile tiofilice erau obținute din suporturi activate cu vinil sulfonă şi din 2-mercapto – etanol. Ambele grupări funcționale, sulfonă şi tioeter, prezente în structura ligandului păreau să acționeze într-o manieră complementară pentru a amplifica afinitatea de legare a proteinei. Realizările mai recente în special în domeniul industrial implică mai mult liganzi compuşi din heterociclii cu atomi de azot sau de sulf. Această metodă de separare a fost aplicată în special pentru purificarea anticorpilor din surse naturale sau proveniți din recombinare datorită specificității certe a agenților adsorbanți față de această clasă de proteine.

Prin modul său de funcționare, cromatografia prin interacțiune tiofilică seamănă cu HIC prin faptul că adsorbția proteinelor este favorizată de săruri cu concentrații ridicate iar eluția are loc când concentrația salină este scăzută. Totuşi, câteva diferențe între cele două tehnici arată modurile diferite de adsorbție a proteinelor. Interacțiunile hidrofobe nu au loc cu adsorbanți tiofilici din moment ce structurile tioetilsulfonice nu posedă o hidrofobie pronunțată. Spre deosebire de HIC, interacțiunile dintre ligand şi proteină sunt relativ independente de temperatură şi clorura de sodiu stimulează desorbția proteinelor. În timp ce albumina este puternic adsorbită de liganzi hidrofobi, agenții de adsorbție tiofilici manifestă o afinitate deosebită pentru imunoglobuline.

Cromatografia prin inducție de încărcare hidrofobă (HCIC) este o tehnică recentă de adsorbție a proteinelor ce implică liganzi bazici sau acizi slabi care sunt neîncărcați la pH fiziologic. Adsorbția se bazează pe asocieri hidrofobe în timp ce desorbția rezultă din respingerea ionică dintre ligand şi proteina adsorbită când pH-ul este schimbat într-o direcție adecvată. Selectivitatea crescută pentru anticorpi poate fi obținută când sunt folosiți liganzi ce combină un situs tiofilic cu structuri

heterociclice ionizabile cum ar fi 4-mercaptoetil piridină [Boschetti, 2002]. Acest ligand (pK_a 4.8) este neîncărcat la pH neutru şi se încarcă prin scăderea pH-ului la 4-5, rezultând desorbția ca şi consecință a forțelor de respingere dintre mediul adsorbant şi anticorpul încărcat pozitiv.

8.6.6. Cromatografia prin covalență

Cromatografia prin covalență, spre deosebire de alte tehnici de afinitate, presupune formarea şi ruperea unor legături covalente între SD şi ligand. Liganzii proteicii sunt adesea ataşați prin intermediul grupărilor N- sau C- , cu scopul de a forma legături stabile care sunt rezistente la condițiile cromatografice şi dificil de eliberat fără distrugerea proteinei. Singura grupare funcțională cu structură chimică adecvată pentru formarea unei legături covalente stabile şi care de asemenea poate fi desfăcută în condiții uşoare este grupul tiol. Astfel cromatografia prin covalență a fost aproape exclusiv aplicată în scopul izolării peptidelor ce conțin grupări tiol. Această tehnică este denumită de unii autori şi cromatografie de adsorbție tiofilică.

În timp ce grupările tiol pot participa la un număr de racții chimice datorită proprietăților de nucleofilie, aşa numitul schimb tiol-disulfid este utilizat în cromatografia prin covalență. Reacția poate fi descrisă astfel:

$$R - S - S - R + 2R_1 - SH \rightarrow 2R - SH + R_1 - S - S - R_1 \qquad (5)$$

Reacția poate fi privită fie ca o înlocuire nucleofilă, fie ca un proces redox, deoarece starea oxidativă a fiecărui atom de sulf se modifică în cursul reacției. Schimbul tiol-disulfid joacă un rol important în procesele biochimice cum ar fi biosinteza proteinelor, agregarea proteinelor şi interacțiunilor ligand - receptor. În practică ligandul este un complex reactiv disulfidic constituit dintr-un tiol alifatic şi un tiol aromatic ca de exemplu 2-tiopiridina. În timpul aplicării, o proteină ce conține tiol va fi imobilizată pe faza solidă ca urmare a reacției tiol-disulfid. Desorbția proteinei se realizează utilizându-se un exces de tiol alifatic cu greutate moleculară mică în faza mobilă. Mai nou, sunt utilizate pentru imobilizarea reversibilă a tiolilor matrici cu tiosulfonați şi tiosulfinați. Aşa cum se poate intui din mecanismul de

reacție prin intermediul cromatografiei prin covalență se pot izola proteine ce conțin nativ grupări tiol sau proteine la care grupările tiol pot fi introduse de exemplu prin reacții de reducere ale punților disulfidice existente.

8.6.7. Cromatografia de afinitate membranară

Termenul de cromatografie de afinitate membranară se referă la formatul suportului. În timp ce la cromatografia de afinitate „normală” matricea de afinitate este susținută de coloane în timpul procesului cromatografic, în metoda prezentată sunt utilizate membrane. Prin utilizarea membranelor pot fi depăşite limitările cromatografiei lichide în coloană cu strat compact date de procesele de compactare ce necesită timp, suplimentarea cu lichid la presiune mare în coloană şi restricțiile de transfer ale maselor. În straturile poroase, transferul maselor este limitat prin difuziunea lentă a substanțelor analizate în pori (la final) a materialului. Membranele sunt constituite din canale poroase consecutive ce permit difuziunea filmului la suprafața membranei în interiorul canalelor ca singura rezistență opusă transportului. Difuziunea filmului este de obicei de câteva ori mai rapidă decât difuziunea prin pori, ceea ce permite ca limitarea proceselor de adsorbție să fie permutate la interacțiunile ligand – substanță dizolvată. Aceste procese sunt identice cu cele din cromatografia pe coloană şi în general foarte rapide. Structura macroporoasă şi faptul că membranele suprapuse în teancuri sunt subțiri în comparație cu straturile compacte din cromatografie determină curgeri la presiuni mici ceea ce permite un flux crescut şi prin urmare timpi de separație mai mici. Capacitatea de legare necesară este atinsă prin folosirea unor suprafețe interne ale membranelor suficient de mari. Avantajul unor fluxuri mari se poate transforma în dezavantajul unui timp prea scurt de contact al soluției. Un singur strat de membrană poate avea teoretic o capacitate mare, dar capacitatea poate fi mult mai mică datorită timpului de interacțiune limitat al probei. În cazul interacțiunilor de afinitate puternice, procesul de eluție al moleculei țintă limitează şi mai mult acest procedeu prin faptul că timpul de contact poate să nu fie suficient pentru o eluție rapidă a materialului legat, rezultând diluții crescute ale probelor recuperate. Abordări menite să depăşească aceste inconveniente includ

folosirea de straturi multiple de membrane în cazul legării insuficiente sau reciclarea eluentului tampon în cazul unei desorbții lente.

Compoziția chimică a membranelor este destul de variată. Sunt folosite materiale pe bază de celuloză şi derivați ai acestora, poliamidă, poliacrilamidă, poliacrilonitril, polisulfonă, polivinildienă, polistiren, polipropilen, polietilenă şi altele. În principiu aceste materiale pot fi conjugate cu orice ligand cu structură chimică similară acelora din modulul de pe coloană. Ca şi în acest din urmă caz, toate tipurile de cromatografie de afinitate pot fi efectuate şi în modul membranar. Acum sunt disponibile comercial membrane activate şi cuplate cu ligand, car au deja multiple aplicații.

8.7. Aplicațiile interacțiunilor de afinitate

Interacțiunile de afinitate pot fi exploatate atât pentru aplicații analitice cât şi de sinteză. Pentru scopuri preparative modul de lucru va fi în cele mai multe cazuri cromatografia de joasă presiune sau tehnologia membranelor, în timp ce HPLC, electroforeza capilară sau biosenzorii vor fi utilizați în primul rând pentru aplicații analitice. În plus, tehnicile de afinitate analitice nu sunt folosite doar pentru determinarea unei anumite molecule în analiza farmaceutică, chimică, clinică sau a mediului, dar şi pentru identificarea ligandului şi studiul interacțiunilor ligand-substanța dizolvată.

8.7.1. Purificarea proteinelor farmaceutice

Datorită evoluției în biotehnologie, proteinele recombinate cuprind acum, pe lângă produşii sanguini şi proteine de origine umană sau animală, un număr crescut de produse farmaceutice. Indiferent de sursă, țesut animal sau uman, ouă, plasmă sanguină, culturi celulare obținute de la mamifere sau culturi bacteriene, sau animale/plante transgenice, toate aceste produse au origine biologică şi necesită o purificare riguroasă. În funcție de originea materialului, impuritățile includ bacterii, virusuri, lipopolizaharide (endotoxine), prioni, ADN, ARN, proteine ale celulei gazdă, carbohidrați, fosfolipide etc. În conformitate cu criteriile Administrației pentru

Alimentaţie şi Medicamente a Statelor Unite (FDA) precum şi ale Agenţiei Europene de Evaluare a Produselor Medicale (EMEA), produsul final biotehnologic trebuie să fie bine caracterizat; el trebuie să aibă puritate, eficienţă, stabilitate, farmacocinetică, farmacodinamică, toxicitate şi imunogenicitate bine definite. Acestea trebuie analizate pentru identificarea materialelor contaminante menţionate mai sus ce provin de la sursă; totuşi proteinele terapeutice conţin adesea un amestec de izoforme ce îşi au originea în modificările posttranslaţionale, plierea defectuoasă, agregarea şi alte reacţii de degradare chimică sau fizică.

Purificarea proteinelor poate varia de la un procedeu simplu de precipitare într-o singură etapă până la procese de producţie la scară largă care au fost validate. În majoritatea cazurilor vor fi necesare mai mult de o etapă pentru îndepărtarea tuturor impurităţilor. Prelucrarea ulterioară a materialelor de producţie, oricare ar fi sursa acestora, presupune de obicei trei etape majore: captarea, purificarea intermediară şi rafinarea uneori cunoscute ca şi CIPP. După prepararea extractului şi separarea de resturi celulare prin procedee ca filtrarea sau extracţia lichid/lichid, obiectivul etapei de captare este izolarea concentrarea şi stabilizarea proteinei. Masa majoritară de impurităţi este îndepărtată în timpul purificărilor intermediare ce urmează etapei descrise, urmând ca în faza finală de rafinare să se atingă puritatea înaltă. Toate cele trei etape implică adesea proceduri cromatografice; etapa de rafinare este uneori compusă din două proceduri de purificare (cromatografice). Cromatografia de afinitate este folosită cel mai eficient în etapele de captare şi purificare intermediară, adesea acestea reducându-se la o singură etapă dacă sunt utilizaţi liganzi cu înaltă selectivitate. Alte tehnici cromatografice frecvent utilizate în purificarea proteică includ filtrarea în gel, cromatografia de schimb ionic şi cromatografia de fază inversă. Cunoaşterea proprietăţilor proteinei ţintă şi ale impurităţilor va fi utilă în cursul efectuării proceselor de purificare.

Până la 50-80 % din costurile de producţie totale ale unui medicament proteic se datorează proceselor de purificare. Multe dintre tehnicile biochimice şi de biologie moleculară standardizate nu sunt neapărat echivalente cu eficienţa de lucru şi de cost a procesului tehnologic. Astfel, din motive economice, de asigurare a calităţii şi de

complianță, protocoalele de purificare convenționale ce presupuneau precipitarea în săruri, la temperatură, pH sau cu polimeri cu greutate moleculară mare au fost schimbate cu tehnici selective bazate pe cromatografia de afinitate. Totuşi şi această abordare are inconvenientele ei. Astfel, când se foloseşte un ligand de afinitate provenit din sursă naturală, FDA pretinde ca ligandul folosit la obținerea produsului biologic să îndeplinească aceleaşi standarde ca şi produsul final. Aşadar poate fi necesară o purificare riguroasă a ligandului. În plus în cursul cromatografiei vor avea loc inevitabil scăpări ale ligandului în produsul final. Față de aspectele toxicologice ce țin de ligand, trebuie să avem în vedere faptul că ligandul va fi asociat cu produsul, formarea complexelor selective fiind un aspect inerent al purificării. Aceste complexe pot fi dificil de îndepărtat din produs. Pe de altă parte prin cromatografia de afinitate este posibilă îndepărtarea substanțelor pirogene şi endotoxinelor. Liganzii biologici pot fi scumpi, crescând astfel costurile de producție. O parte din aceste dezavantaje pot fi depăşite prin folosirea liganzilor sintetici, care de altfel pot fi înalt selectivi. Limitele coloanelor de afinitate datorate presiunii mari de lucru şi limitărilor cineticii de transfer a maselor pot fi depăşite folosind tehnologia membranelor.

8.7.1.1. Proteine plasmatice

Proteine cu efect terapeutic cum ar albumina, factorii de coagulare şi imunoglobulinele au fost izolate din sângele uman cu mulți ani în urmă. În ciuda apariției produselor obținute prin recombinare, cea mai importantă sursă pentru asemenea produse rămâne în continuare izolarea din sângele uman. Deşi metodele tradiționale de fracționare a plasmei bazate pe etape de precipitare cu etanol sunt încă cele mai folosite în producția curentă a preparatelor de albumină şi imunoglobulină G cu rol terapeutic, cromatografia de afinitate a fost introdusă în prepararea industrială a factorilor de coagulare VIII, IX şi XI, von Willebrand, fibronectina, antitrombina III, inhibitorul inter–α–tripsinei şi proteina C derivată plasmatic. În timp ce cromatografia de afinitate este folosită pentru captarea factorului VIII şi factorului IX folosind heparină imobilizată sau anticorpi monoclonali ca şi liganzi de afinitate, şi antitrombină III prin captarea pe un ligand de heparină din probe proaspete, tehnica

este folosită ca etapă de rafinare intermediară în cazul altor produşi. Uneori cromatografia de afinitate este folosită la îndepărtarea impurităților cum ar fi fibronectina de pe factorul von Willebrand folosind un ligand de gelatină. Factorul von Willebrand nu se leagă de gelatină şi este recuperat în fracția de ieşire, fibronectina fiind adsorbită pe coloană. Deşi albumina poate fi legată de coloranți, nici un procedeu comercial nu foloseşte cromatografia de afinitate pentru izolarea acestei proteine.

8.7.1.2. Proteine recombinate

Proteine recombinate cu implicații terapeutice denumite şi produse farmaceutice biotech (biotech pharmaceuticals), sunt produse prin tehnologia recombinării ADN. Acestea susțin o piață de desfacere mare cu o cifră de vânzare estimată de 16-17 miliarde de dolari americani în 2001. Actualmente pe piață se regăsesc mai mult de 50 de astfel de produse iar peste 40 sunt în faza III şi peste 60 în faza II de trialuri clinice. Anticorpii monoclonali reprezintă segmentul cu cea mai rapidă creştere, cu peste 20 de produse comercializate şi peste 20, 45 de produse în faza III respectiv în faza II. Insulina, hormonii de creştere, eritropoietina, interferonii, interleukinele, factorii de stimulare ai coloniilor granulocitare, enzime, factori de coagulare, vaccinuri şi anticorpi monoclonali reprezintă produse farmaceutice biotech. Deşi procesele de producție nu sunt dezvăluite din cauza drepturilor de autor, acestea conțin cu siguranță etape de cromatografie de afinitate. Mai mult, tehnica este utilizată şi mai extins în laboratoare, în cercetare şi dezvoltare.

Se pot distinge două tipuri de abordări generale. În primul tip proteina „nativă” interacționează cu ligandul, iar a doua abordare implică aşa numitele terminații de afinitate fuzionate cu proteina de interes în care terminația se ataşează la ligand în timp ce proteina propriu-zisă nu se ataşează. Tehnologia de fuziune proteică a devenit un instrument important în producția de proteine recombinate. Au fost elaborate o varietate de vectori de expresie cu secvențe terminale diferite pentru fuziunea aproape oricărui tip de proteine țintă ce poate fi clonată şi exprimată în celule gazdă.

Interacțiunile ce au fost utilizate ca bază pentru afinitatea proteinei de fuziune includ interacțiuni ale enzimelor cu substraturi sau inhibitori, interacțiuni carbohidrat - proteină, domenii de legare a biotinei, interacțiuni antigen – anticorp, aminoacizi încărcați pentru metode bazate pe încărcătură şi resturi poli(His) pentru legări metal-chelator (tabelul 8.5) [Einhauer, Jungbauer, 2001]. Fiecare secvență terminală are propriile avantaje şi dezavantaje şi selecția trebuie făcută pe baza proteinei de interes şi tehnicii de afinitate adecvată.

Tabelul 8.5. Secvențe terminale de afinitate pentru proteine recombinate

Secvență terminală fuzionată	***Dimensiune***	***Fuziune la capătul C- sau N- terminal***
Enzime		
glutation-S-transferaza	26 kDa	N
β-galactozidaza	116 kDa	C, N
Domenii de legare polipeptidice		
domeniul de legare IgG al proteinei A	14 – 31 kDa	N
domeniul de legare IgG al proteinei G	28 kDa	C
Domenii de legare ale carbohidraților		
proteina de legare a maltozei	40 kDa	N
domeniul de legare al celulozei	111 aninoacizi	N
Domenii de legare streptavidină-biotină		
domeniul de legare al biotinei	8 kDa	N
Strep-tag	9 aminoacizi	C, N
Epitopi antigenici		
FLAG™ –tag	8 aminoacizi	N
Aminoacizi încărcați		
poli(Arg)	5 - 15 kDa	C
poli(Asp)	5 16 kDa	C
Interacțiuni metal – chelator		
poli(His)	4 – 9 kDa	C, N

Se consideră că, o secvență terminală nu ar trebui să intervină asupra modului natural de pliere al proteinei şi nu ar trebui să inhibe funcția ei normală sau situsurile ei active şi ar trebui să fie expusă pe suprafața proteinei pentru un maxim de interacțiune cu ligandul.

În plus secvența terminală ar trebui să fie potrivită unor procedee de afinitate uşoare şi de preferat ieftine, şi ar trebui să poată fi uşor îndepărtată. În mod curent în tehnologia proteinelor recombinate sunt folosite predominant secvențele terminale poli(His), deoarece par a fi compatibile cu toate sistemele de expresie folosite în prezent.

Prin folosirea unor suporturi de afinitate adecvate, cum ar fi suporturi magnetice, abordările bazate pe secvențe terminale pot fi aplicate şi în procesarea robotizată a probelor pentru purificarea automatizată a proteinelor. Întrebarea dacă secvența terminală trebuie sau nu trebuie să fie îndepărtată, depinde de utilizarea finală a proteinei. Pentru caracterizarea proteinelor sau pentru scopuri diagnostice poate fi posibil ca secvența terminală să rămână ataşată; totuşi pentru aplicații farmaceutice îndepărtarea precisă a peptidului fuzionat va fi necesară în cele mai multe cazuri pentru a certifica autenticitatea produsului.

În plus, secvențele terminale pot fi imunogenice, în special terminația FLAG^{TM} care a fost concepută pentru a fi imunogenă. Astfel, în proteinele de fuziune au fost concepute situsuri de clivaj destinate proteazelor. Totuşi acest lucru necesită îndepărtarea în siguranță a enzimei şi a secvenței clivate de pe proteina de interes şi adaugă în plus etape de purificare şi costuri adiționale.

De asemenea poate avea loc degradarea proteolitică a produsului. Astfel, deşi în laborator este o tehnică excelentă, pentru producția industrială, la scară largă a proteinelor, folosirea acestor secvențe terminale de afinitate poate să nu fie întotdeauna adecvată.

În afara folosirii lor la purificarea prin afinitate a proteinelor recombinate, anumite secvențe terminale pot fi utilizate şi în domeniul detecției specifice în aplicații imunochimice în condiții ce produc denaturarea în tehnica Western blot dar şi în stare nativă pentru ELISA, constituindu-se într-un instrument de analiză util pentru monitorizarea nivelului expresiei proteinelor sau pentru urmărirea unei proteine în timpul proceselor de purificare.

8.7.2. Aplicații analitice

Cromatografia de afinitate poate fi folosită sub diverse forme pentru separarea sau analiza anumitor substanțe solubile. Separarea cromatografică a unei substanțe care acționează cu un ligand de afinitate poate fi primul pas în cuantificarea concentrației sale în soluție. Sistemele ce utilizează cromatografia de afinitate de înaltă performanță (HPAC) şi electroforeza de afinitate capilară, au fost construite pentru a creşte viteza acestui proces şi pentru automatizarea măsurătorilor. Metodele tradiționale de imunoanaliză pot fi proiectate pe baza liganzilor de afinitate imobilizați folosind suporturi cum ar fi perle, geluri sau plăci. Detecția electronică a interacțiunilor de afinitate au dus la dezvoltarea biosenzorilor de afinitate care nu fac doar determinarea concentrației substanței de analizat ci pot face şi o caracterizare cantitativă a interacțiunilor de afinitate. În plus tehnica poate fi adaptată şi screeningului de mare capacitate (HTS).

Tehnicile de afinitate sunt întrebuințate şi pentru îndepărtarea specifică a componentelor dintr-o probă ce interferă cu capacitatea sistemului analitic. Una dintre dificultățile majore ale analizei peptidelor şi proteinelor din serul uman este intervalul mare de concentrații pe care le pot atinge proteinele în probă. Albumina serică umană variază de la aproximativ 55% la 75%, iar imunoglobulinele variază de la aproximativ 8 până la 25%. Îndepărtarea acestor proteine poate fi realizată cu ajutorul matricelor de „depleție prin afinitate” disponibile comercial ce conțin anticorpi pentru proteina G care reduc semnificativ încărcarea proteică a probei permițând analiza componentelor minoritare.

„Extracția prin afinitate” defineşte procedeul prin care substanța analizată este izolată specific şi concentrată prin cromatografie de afinitate dintr-o probă înaintea analizei prin altă metodă fie off-line fie online. Metoda off-line utilizează tipic coloane de afinitate de joasă performanță ambalate în cartuşe de unică folosință. În metoda online, la coloana analitică este conectată o coloană HPLC ce conține matricea de afinitate prin intermediul unei valve de pornire.

Tehnicile analitice sunt din ce în ce mai mult folosite la descoperirea medicamentelor pentru identificarea liganzilor (ligand fishing) şi a structurilor

precursoare şi în ADME (adsorbție, distribuție, metabolism şi excreție) precoce cu scopul studierii interacțiunilor dintre ligand şi substanța analizată, cum ar fi legarea medicament proteină, inclusiv aspecte stereochimice, pentru determinarea complexului stoichiometric, pentru estimarea constantelor de legare şi a dinamicii de legare. Desigur metodele pot fi utilizate şi în stadii ulterioare ale elaborării unui medicament pentru analiza potențialelor medicamente.

8.7.2.1. Cromatografia de afinitate de înaltă performanță (HPAC)

HPAC combină specificitatea interacțiunilor ligand - substanță de analizat cu viteza, eficiența şi automatizarea HPLC. Teoretic orice ligand poate fi mobilizat pe suporturi ce pot rezista presiunilor înalte aplicate în HPLC. Exemple de suporturi de afinitate ce sunt adecvate acestor condiții includ gelul de siliciu sau sticlă modificat, perle de azlactonă sau medii de polistiren hidroxilat. Stabilitatea şi eficiența acestor suporturi permite utilizarea lor în echipamentul standard HPLC. Deşi materialele din HPLC fac din HPAC o metodă mai scumpă în comparație cu cromatografia de afinitate de joasă performanță, HPAC poate fi un instrument foarte util pentru determinări analitice în plus față de potențialul său de purificare a compuşilor cu viteze ridicate.

Probabil cel mai cunoscut exemplu de aplicație analitică a cromatografiei de afinitate este determinarea hemoglobinei glicozilate în laboratorul clinic, ca expresie a nivelurilor medii ale glucozei sanguine în timp, pentru controlul diabetului. Hemoglobina glicozilată poate fi separată de varianta nativă folosind acid aminofenilboric ca ligand, şi raporturile relative ale fracțiunilor glicozilate şi neglicozilate sunt cuantificate prin absorbanța hemoglobinei la 414nm. Anterior au fost prezentate succint şi alte aplicații clinice. HPAC ce foloseşte proteina A imobilizată ca şi ligand a fost utilizată pentru analiza imunoglobulinelor plasmatice sau din diferite medii de cultură, iar cromatografia de afinitate cu lectină a fost utilizată pentru determinarea izoenzimelor sau microheterogenității glicoformelor glicoproteinelor. Totuşi, majoritatea aplicațiilor recente ale cromatografiei de afinitate analitice au fost în domeniul interacțiunilor proteină-medicament. Concret,

HPAC a fost folosit pentru analiza ataşării medicamentului de proteină (albumina), inclusiv a aspectelor legate de stereospecificitate [Hage, 2002], dar este posibilă şi determinarea interacţiunilor enzimă-substrat.

În tehnica de eluție zonală (cea mai folosită metodă de studiere a interacţiunilor medicamentoase cu o fază staționară proteică în HPAC) schimbarea timpului de retenție al factorului de capacitate k' este monitorizat ca o funcție a concentrației a unui agent ce competiționează în faza mobilă. Metoda de eluție frontală este o altă tehnică utilizată în HPAC. Coloana este constant alimentată cu o soluție ce are o concentrație cunoscută a substanței dizolvate. În timp ce SD se leagă de ligand, ligandul devine saturat şi cantitatea de compus ce eluează din coloană creşte, formând o curbă ascendentă. Din aceste experimente poate fi obținută informația calitativă şi cantitativă, incluzând comparații ale afinității relative de legare, înlocuirea prin competiție a unei substanțe analizate de către alți compuşi sau determinarea constantelor de echilibru şi de debit.

Cromatografia de imunoafinitate de înaltă performanță (HPIAC) devine un instrument din ce în ce mai comun pentru analiza compuşilor biologici şi sintetici. În plus față de utilizarea acesteia pentru detecția directă a substanțelor utilizate în analize cromatografice şi imunoextracția substanțelor analizate, coloanele de imobilizare pentru anticorpi şi antigene sunt aplicate pentru diverse tipuri de imunoanalize. Această abordare cunoscută şi ca imunoanaliză cromatografică este adecvată în special pentru determinarea unor urme de substanțe care prin ele însele nu produc un semnal detectabil facil. Acest impediment este depăşit prin imunoanalizele cromatografice folosind un anticorp marcat sau un analog al substanței de analizat pentru detecția indirectă. Modalitățile comune includ analize de competitivitate, analize sandwich şi analize imunometrice one-site (un situs). În locul anticorpilor pot fi folosite şi fragmente Fab. Inițial marcajele erau reprezentate de enzime sau capete terminale fluorescente.

Ca şi în analizele „staționare”, principiul imunoanalizelor prin legare competitivă implică incubarea probelor cu o cantitate prestabilită de substanță de analizat marcată în prezența unei cantități limitate de anticorpi. Analiza poate fi

efectuată prin injectarea simultană, detectându-se fie marcajul care eluează cu fracțiunile spălate fie compusul marcat care eluează în etapa de disociere. În injecția secvențială, marcajul este realizat după injectarea probei şi este analizat fie în materialul nereținut, fie în materialul reținut. În metoda prin substituție, coloana este întâi saturată cu analogul marcat, urmând injectarea probei, analiza cantității de compus marcat care este spălat şi îndepărtat din coloană prin disocierea locală şi reconstituirea complexului. În analizele imunometrice tip sandwich two-site (două situsuri), sunt utilizați doi anticorpi diferiți care se leagă de substanța de analizat. Primul se ataşează de suportul solid şi este utilizat pentru extracția moleculei țintă iar al doilea anticorp este marcat şi este adăugat probei fie înainte, fie după injecția acestuia în coloană. Al doilea anticorp marchează substanța de analizat pentru a permite detecția acesteia. În analizele imunometrice one-site, proba este incubată cu o cantitate în exces cunoscută de anticorp marcat. Acest amestec este ulterior aplicat unei coloane cu un analog imobilizat al substanței de analizat care serveşte la extracția anticorpilor care nu au fost legați de proba de analizat. Detecția se face prin măsurarea fie a componentei marcate nereținute fie a anticorpului care este disociat ulterior din coloană în etapa de eluție. Prin HIPAC au fost analizați mulți compuşi printre care enzime, hormoni şi proteine dar şi molecule sintetice cum este teofilina. De asemenea este posibilă şi imunodetecția post-coloană pentru cuantificarea unei anumite substanțe de analizat ce eluează dintr-o coloană HPLC prin utilizarea unui reactor post-coloană şi a unei coloane cu anticorp sau antigen imobilizat conectat la ieşirea coloanei HPLC analitice.

8.7.2.2. Electroforeza capilară de afinitate

Electroforeza capilară de afinitate este o tehnică analitică în care sunt înregistrate modelele de migrare ale interacțiunilor moleculare în câmp electric. Metoda este o variantă a electroforezei capilare folosită la identificarea legăturilor specifice şi la estimarea constantelor de legare cu condiția ca interacțiunile să nu fie inhibate de condițiile de separare şi ca moleculele ce formează complexe să poată fi diferențiate de cele necomplexate. Astfel interacțiunea trebuie să schimbe molecula

ca şi dimensiune, formă, încărcare sau orice alți parametrii responsabili pentru o încărcare în sistemul de separare electroforetic. Avantajele folosirii electoforezei capilare sunt marea varietate de substanțe ce pot fi analizate, viteza de analiză şi consumul redus de probe şi substanțe. Un dezavantaj este limita concentrației detectabile adesea nesatisfăcătoare, în special când se aplică detecția UV. În principiu metoda poate fi transferată şi tehnologiei chip.

Liganzii pot interacționa cu substanța analizată fie înainte, fie în timpul desfăşurării propriu-zise a electroforezei. Ultimul procedeu reprezintă metoda clasică de electroforeză de afinitate care este analogă cromatografiei de afinitate. Pentru analiza interacțiunilor cu afinitate slabă sau intermediară liganzii sunt utilizați liberi în soluție sau imobilizați pe peretele capilar şi substanța de analizat se deplasează în concentrații constante de liganzi. În timpul interacțiunii cu ligandul se observă o schimbare a timpului de migrare a substanței de analizat ce depinde de concentrația ligandului. Această metodă nu necesită o concentrație cunoscută a probei şi nici compuşii nu trebuie să fie puri. Pot fi analizate bănci de compuşi. Prin electroforeza capilară sunt studiate în mod tipic interacțiuni puternice, ca metodă de separare şi cuantificare a substanței de analizat liberă sau legată într-un amestec de preincubare într-o singură etapă.

Electroforeza capilară de afinitate a fost utilizată la analiza constantelor de legare, a dinamicii de legare şi a stoichiometriei de legare a numeroase complexe ligand – substanță de analizat, incluzând interacțiuni peptidă – peptidă, peptidă – oligonucleotidă, peptidă – heparină, proteină – ion metalic şi antigen – anticorp. Electroforeza capilară de afinitate cu schimb de migrare poate fi utilizată în scopul cercetării amestecurilor de compuşi pentru studiul afinității față de ligand, mai ales asociată cu spectrometria de masă, şi pentru studii structură-funcție. În plus electroforeza capilară de afinitate este un element valoros pentru determinarea legării medicament-proteină inclusiv a aspectelor legate de stereochimia acestor interacțiuni.

Un domeniu de aplicații analitice în extindere este imunoanaliza bazată pe electroforeză capilară, definită şi electroforeză capilară de afinitate a probei. În aceste tehnici, substanței de analizat i se permite să acționeze cu un anticorp iar complexul

rezultat este separat de substanța de analizat liberă prin electroforeză capilară. Au fost descrise două tipuri distincte. În analiza directă sau noncompetitivă, proba pentru studiul de afinitate marcată de regulă cu un fluorofor este adăugată probei pentru legarea de molecula țintă. Detecția complexului reprezintă o măsură directă a probei în soluția probă. În analiza competitivă, o țintă marcată fluorescent şi o cantitate limitată de anticorp sunt adăugate probei permițând țintei marcate şi țintei din probă să competiționeze pentru anticorp. Moleculele marcate libere sau în complexe sunt separate şi detectate, cantitățile relative de compuşi marcați liberi sau legați depinzând de concentrația substanței de analizat din probă. Imunoanalizele prin electroforeză capilară s-au dovedit a fi metode versatile pentru o varietate de substanțe de analizat şi matrice probă [Heegaard, Kennedy, 2002]. S-au făcut determinări pe medicamente, hormoni, peptide, proteine, toxine, şi chiar virusuri şi bacterii. Substanțele de analizat pot fi măsurate direct în ser sau urină dar şi în probe de celule sau tisulare. Interesant, prima imunoanaliză pentru scrapia, prototipul encefalopatiei spongiforme, s-a bazat şi pe electroforeza capilară. În plus, imunoanalizele pot fi transferate şi pe chip-uri permițând timpi de analiză extrem de reduşi. Un exemplu este dezvoltarea unei imunoanalize electroforetice capilare bazate pe chip pentru determinarea teofilinei în ser, unde electroforeza este completă în 35 secunde.

8.7.2.3. Biosenzori de afinitate

Realizările tehnicilor de imobilizare şi inovațiile din domeniul bioelectronicii au dus la elaborarea unor noi dispozitive de detecție bazate pe interacțiunea specifică dintre receptori, enzime şi anticorpi cu moleculele lor țintă specifice, creându-se dispozitive de detecție noi pentru domenii diverse cum ar fi controlul diagnosticului, tratamentului, controlul mediului şi al deşeurilor şi analiza dinamică a interacțiunilor substanțelor biologice. Deşi nu se bazează pe principii de separare cromatografice sau electroforetice, pentru funcționarea lor aceşti senzori implică interacțiuni de afinitate. În plus biosenzorii sunt utilizați din ce în ce mai mult în multe domenii ale descoperirii de medicamente, incluzând identificarea țintei, „ligand fishing”, selecția

precursorului, elaborarea analizei, studii ADME precoce şi controlul calităţii [Cooper, 2002].

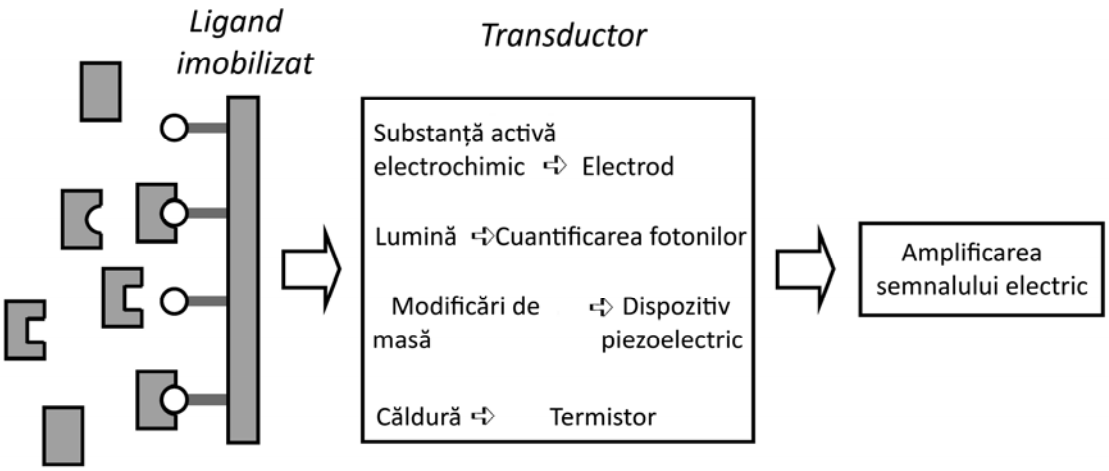


Fig. 8.3. Principiu schematic al biosenzorilor

Biosenzorii de afinitate sunt dispozitive biosenzor cu tranzistori ce funcţionează fără piese mobile bazate pe afinitatea ligandului în care interacţiunea moleculară ligand -ţintă este cuplată la un transductor ce converteşte reacţia biologică într-un semnal de ieşire electronic (fig. 8.3). Ligandul imobilizat poate fi orice moleculă (bio)specifică care interacţionează cu o moleculă ţintă. Poate fi chiar şi o celulă vie intactă care interacţionează cu substanţe specifice în soluţie cu care vine în contact. Transductorul „simte" modificările chimice subtile care au loc între ligandul imobilizat şi substanţa analizată. Procesul de detecţie poate implica efecte electrice cum ar fi modificări potenţiometrice sau fluctuaţii amperometrice, efecte optice cum ar fi absorbţia sau difracţia luminii, modificări ale densităţii sau masei precum şi diferenţe termice. Semnalele electronice sunt ulterior amplificate şi înregistrate. Dintre toate sistemele de detecţie probabil cel mai răspândit sistem este sistemul optic SPR (surface plasmon resonance), fiind disponibile comercial câteva tipuri de astfel de instrumente. SPR detectează modificări ale indicelui de refracţie din imediata vecinătate a stratului de suprafaţă a chip-ului senzor datorită legării moleculelor de suprafaţa liganzilor imobilizaţi. Această modificare este urmărită în timp real pentru determinarea concentraţiei unei substanţe analizate legate, a afinităţii substanţei

analizate față de ligand şi a dinamicii interacțiunilor de asociere şi disociere (fig. 8.4). Pot fi analizate o varietate extrem de mare de molecule, de la celule şi bacteriofagi până la compuşi cu greutate moleculară mică cu mase relative până la 200 Da. Pot fi cercetate interacțiuni de afinitate înaltă sau joasă.

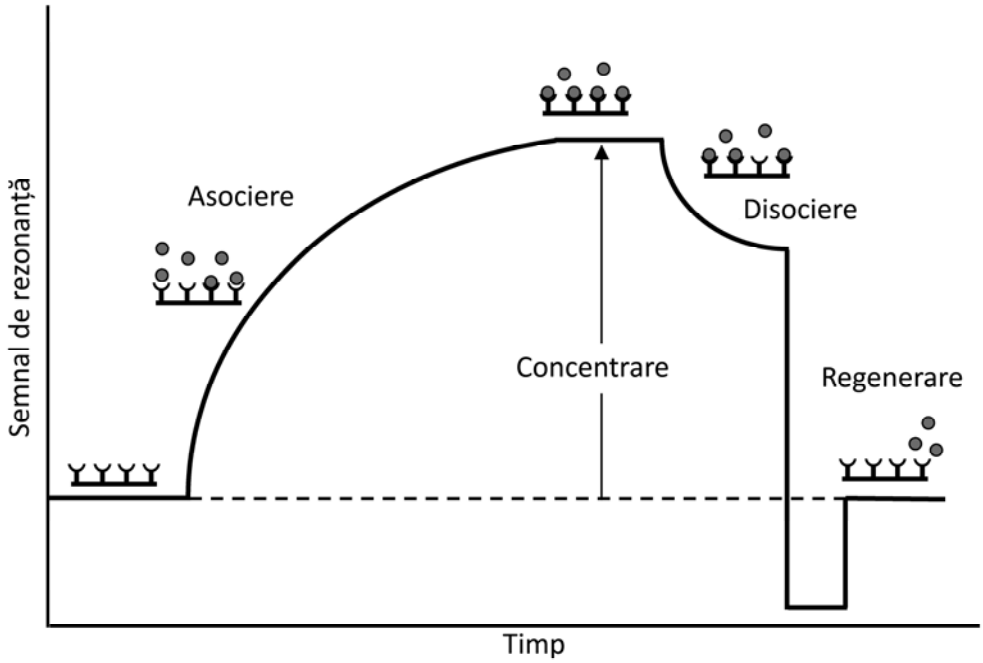


Fig. 8.4 Curba de legare tipică a unui biosenzor optic. Concentrația substanței de analizat rezultă din nivelul de răspuns la echilibrul curbei, în timp ce dinamica de legare poate fi calculată din rata de asociere respectiv rata de disociere observate. De obicei, este necesară refacerea ligandului prin eluția în trepte, multe interacțiuni având durată de supraviețuire considerabilă. Ciclul de legare este repetat folosind diferite concentrații ale substanței de analizat, pentru obținerea unor date compatibile unui algoritm de legare.

Substanțele chimice utilizate pentru imobilizarea ligandului sunt comparabile cu cele folosite pentru coloanele de afinitate. Un procedeu special este chimioadsorbția spacer–ilor (distanțatorilor) ce conțin sulf pe suprafețe de aur. Stabilitatea acestor legături o depăşeşte pe cea a legăturilor covalente de silan (SiH_4) cu sticla. Ulterior se poate realiza ataşarea ligandului prin intermediul grupărilor reactive ale distanțatorului. Ditiobis-succinimidil propionat este un distanțator comun al protocoalelor de imobilizare bazate pe chimioadsorbție. În plus sunt disponibile comercial chip-uri cu suprafețe preactivate.

În principiu orice moleculă şi chiar celule întregi pot fi imobilizate în biosenzori pentru analiza unui compus–țintă dat. Există şi metode prin care receptori transmembranari au fost reconstituiți în lipozomi sau în straturi lipidice ataşate sau adsorbite pe suprafața chip–ului. Când se analizează anumite molecule, aşa numiții imunosenzori ce conțin anticorpi imobilizați sunt utilizați frecvent în laboratorul clinic şi în chimia mediului, dar şi pentru detecția bacteriilor şi virusurilor în monitorizarea proceselor de igienizare şi alimentație. Există şi o lucrare asupra elaborării unui biosenzor constituit dintr-un anticorp monoclonal împotriva lipopolizaharidelor pirogene utilizat pentru detecția substanțelor pirogene în apă având limite de detecție mai joase decât limitele reglementate prin Farmacopeea Statelor Unite [Taylor, şi colab., 2002]. „Aptasensori" ce conțin aptameri imobilizați par a profila o nouă clasă de biosenzori datorită avantajelor pe care aceştia le au față de anticorpi [O'Sullivan, 2002].

În prezent, biosenzorii optici sunt folosiți în elaborarea medicamentelor pentru a confirma semnalele provenite de la HTS fluorescent, chemoluminiscent sau radiometric, şi pentru optimizarea precursorilor. În plus față de identificarea legăturilor intermoleculare, biosenzorii permit cercetarea dinamicii interacțiunilor biospecifice între liganzi şi molecule țintă în timp real. Biosenzorii pot fi folosiți şi pentru identificarea partenerilor de legare în cursul experimentelor ligand – fishing, inclusiv a băncilor combinatorii sau cercetarea extractelor tisulare şi celulare. O dată identificată o substanță de legare, poate fi efectuată secvențierea aminoacizilor prin spectrometrie de masă folosind biosenzorul ca dispozitiv de purificare prin afinitate micro – preparativă. Biosenzorii apropiați de TOFMS (time-of-flight mass spectrometry) desorbție/ionizare laser matrix asistată pot fi folosite şi pentru studierea evenimentelor consecutive de legare, sistemelor de legare competitive şi pentru caracterizarea funcțională şi structurală a proteinelor incluzând modificările posttranslaționale în proteomică. Metode integrative de detecție prin spectrometrie de masă şi biosenzori pot furniza informații suplimentare despre funcția țintei şi specificitățile de legare, ceea ce poate duce la accelerarea elaborării de noi medicamente. În afară de determinarea interacțiunii medicament – țintă, biosenzorii

au fost utilizați la monitorizarea producerii anticorpilor şi citokinelor, pentru precizarea legării medicament – proteină în estimarea precoce a ADME şi în controlul calității, metodele de analiză putând fi validate în concordanță cu recomandările Conferinței Internaționale pentru Armonizare (IHC) ale Cerințelor Tehnice pentru Înregistrarea Produselor Farmaceutice de Uz Uman. Ulterior, tehnologia a fost aplicată analizelor serologice ale probelor din clinică pentru determinarea titrurilor anticorpilor.

CAPITOLUL 9

IDENTIFICAREA MEDICAMENTELOR PE BAZA REZONANȚEI MAGNETICE NUCLEARE

9.1. Introducere

Obținerea medicamentelor se confruntă cu noi provocări, odată cu numărul mare de proteine produse în era post-genomică. Determinarea structurii, care este acum îmbunătățită şi mult mai rapidă datorită cristalografiei cu raze X şi a spectroscopiei prin rezonanță magnetică nucleară (RMN), oferă bazele pentru noile posibilități de producție a medicamentelor pe baza structurii. Astfel, screening-ul proteinelor pentru băncile de molecule mici, a devenit o problemă importantă. In timp ce metodele de screening de mare capacitate (HTS) permit sute sau mii de scanări într-un timp scurt, necesitatea tehnologiilor de screening „inteligent" care pot detecta componente omise de filtrul HTS, este în continuă creştere.

Screening-ul inteligent, care poate identifica aspecte ale funcțiilor proteinelor, devine din ce în ce mai important, pe măsură ce noi ținte sunt obținute din baza de date genomică. Deşi analizele cu raze X pot determina structurile proteinelor fără limitări datorită dimensiunii, mult mai rapid decât spectroscopia RMN, cea din urmă are avantajul unei analize mai detaliate a interacțiunilor liganzilor. In ciuda complexității unor parametrii RMN, există parametri sensibili şi uşor accesibili care sunt supuşi modificărilor în spectrul corespunzător proteinelor, în urma legării ligandului. Mulți dintre aceşti parametri au putut fi utilizați pentru a dezvolta protocoale rapide de screening. În relația structură-activitate (SAR) prin RMN, sunt observate rezonanțele proteinelor.

Modificările în structura proteinelor induse de legarea ligandului, care cauzează transformări chimice (*chemical shift,* dependența energiei magnetice nucleare de mediul electronic din moleculă), sunt utilizate pentru a detecta localizarea

la nivelul proteinei a locului interacțiunii cu ligandul. Tehnica este utilizată pentru screening-ul inițial şi pentru rafinarea subsecventă. SAR prin RMN necesită marcarea izotopică a proteinei şi este de obicei limitată la proteine cu o greutate moleculară mai mică de 30-40 kDa. Această limită a fost recent extinsă la proteine cu greutatea moleculară de aproximativ 100 kDa prin utilizarea unor noi strategii de marcare.

Alternativ, poate fi observat spectrul RMN al ligandului. Această clasă de tehnici oferă informații asupra legării ligandului. Mulți parametri RMN ai ligandului sunt utilizați pentru a detecta interacțiunea cu proteina. Unele dintre aceste tehnici permit cartografierea epitopilor de legare, oferind astfel informații importante pentru obținerea medicamentelor. Alte metode bazate pe ligand au un potențial important pentru HTS.

Cele două abordări sunt complementare, oferind informații referitoare la cele două fețe ale interacțiunii. Prima parte a acestui capitol descrie SAR prin RMN, iar cea de-a doua parte descrie tehnici pentru observarea liganzilor. Câteva review-uri au descris aspecte diferite ale screening-ului prin RMN [Roberts, 2000; Shapiro, Wareing, 1998; Diercks şi colab., 2001]. Un referat general recent oferă o descriere comprehensivă a acestui domeniu, cu numeroare detalii tehnice. Intenția acestui capitol este de a oferi o privire generală asupra celor mai importante tehnici utilizate în screening-ul RMN [Stockmann, Dalvit, 2002].

9.2. Relația structură-activitate (SAR) prin RMN

SAR prin RMN, propus pentru prima dată de Fesik şi colab. (1996), este bazată pe observarea modificărilor transformărilor chimice în spectrele H^1-N^{15}-heteronuclear single quantum spectroscopy (HSQC) datorate interacțiunilor liganzilor. Semnalele în spectrele H^1 N^{15}-HSQC(coerența cu cuantum simplu a unui heteronucleu C^{13} sau N^{15}) reprezintă scheletul amidic al proteinelor (grupările NH_2 ale Asn şi Gln).

Din moment ce transformările chimice ale amidelor sunt foarte sensibile la conformația aminoacizilor şi la interacțiunile electrostatice ale scheletului HN şi CO , rearanjamente minore la nivelul proteinelor, inițiate de legarea ligandului pot cauza modificări chimice semnificative. Este importantă definirea pragului standard pentru

evaluarea transformărilor chimice. Hajduk (2000) a arătat că modificările chimice $\Delta\delta$ sunt semnificative în evaluarea de ansamblu a dimensiunilor spectrale mai mari de 0,1 ppm:

$$\Delta\delta = \sqrt{(\Delta\delta(^{1}H))^2 + (0{,}2 \cdot \Delta\delta(^{15}N))^2} > 0{,}1\ ppm$$

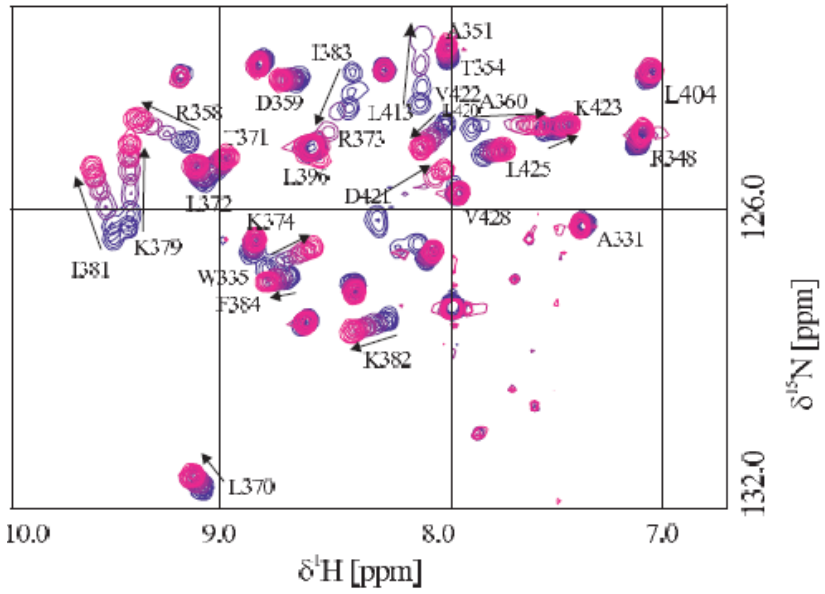
Această presupunere este aproape identică cu definiția anterioară :

$$\Delta\delta = 5 \cdot |\Delta\delta(^{1}H)| + |\Delta\delta(^{15}N)| > 4{,}5\ ppm$$

Ambele relații reprezintă aproximativ o perturbare a transformărilor chimice cu o valoare similară cu mărimea tipică a semnalului în spectrul HSQC.

Figura 9.1 prezintă exemple ale spectrelor HSQC obținute pentru concentrații crescânde de liganzi. Cele două spectre au fost înregistrate pentru domeniul SH2 N-terminal al fosfatidilinozitol-3-kinazei în urma utilizării a doi liganzi diferiți, fosfotirozina (ptyr, stânga) şi un ligand peptidic care se leagă cu o constantă de disociere micromolară.

Cei doi liganzi determină seturi diferite de modificări ale spectrului, reprezentând interacțiuni diferite ale ligandului cu proteina. Peptidul mai mare (EEEpYMPME-NH_2) determină efecte adiționale comparativ cu Ac-ptyr-NH_2 şi perturbări mai importante ale transformărilor chimice.



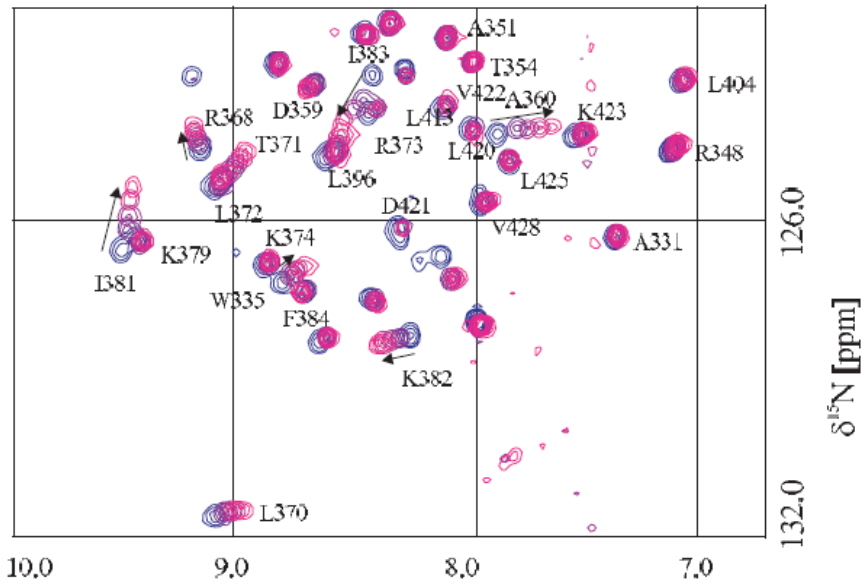


Figura. 9.1 Spectrele p85-N-SH$_2$ ale PI3-kinazei înregistrate la concentrații diferite (albastru – roşu) ale ptyr (stânga) şi pentru un peptid cu afinitate crescută. Modificările indicate de transformările chimice sunt dovada diferențelor caracteristice între cei doi liganzi.Mai puține semnale sunt afectate în cazul ptyr, iar perturbările chemical shif sunt mai mici.

În SAR prin RMN, sunt adăugați simultan câțiva liganzi la o proteină şi perturbările transformărilor chimice sunt desfăşurate în experimente subsecvente cu un singur ligand. Procesul descoperirii modulatorilor cu molecule mici şi optimizării ligandului este prezentat în figura 9.2. Screening-ul inițial oferă liganzi cu afinitate scăzută care trebuie optimizați. Modulatorii cu molecule mici pentru două situsuri de legare diferite trebuie să fie identificați în procesul inițial de screening. Două fragmente optimizate sunt unite pentru a forma un ligand mai mare cu afinitate crescută pentru proteină. Combinarea cu informațiile structurale referitoare la proteină ajută la adaptarea sintetică a ligandului la situsul de legare al proteinei. Publicația inițială a SAR prin RMN de către Fesik şi colab. (1996) a prezentat experimente de legare cu proteina de legare FK506 (FKBP). Au fost identificați numeroşi compuşi cu afinitate scăzută pentru două situsuri de legare diferite. La final, două molecule au fost delimitate cu ajutorul liganzilor cu lungimi diferite. În acest proces au fost obținuți inhibitori cu afinitate nanomolară.

Principiul SAR prin RMN era cunoscut şi utilizat ocazional cu mult timp înainte de introducerea sa ca metodă de screening.

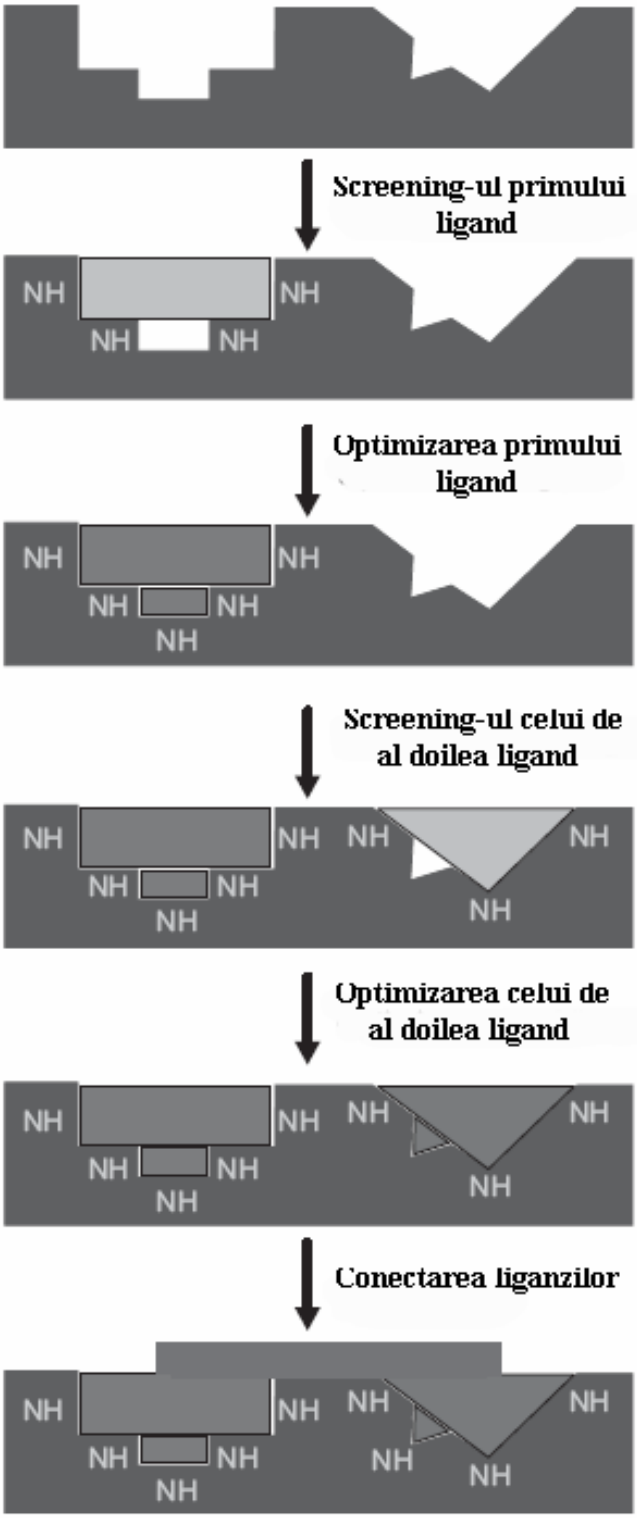


Figura 9.2. Reprezentare schematică a SAR prin RMN. Screening-ul inițial detectează compuşi cu afinitate scăzută pentru cele două situsuri de legare. După ce afinitatea moleculelor modulatoare a fost optimizată, cele două fragmente sunt conectate într-un mod care menține legarea la ambele situsuri.

În unele experimente inițiale, interacțiunile domeniului SH_2 au fost probate cu ajutorul HSQC şi spectroscopiei totale de corelație (total correlation spectroscopy - TOCSY) [Gunther şi colab., 1996]. Cu toate acestea, lucrarea lui Fesik despre SAR prin RMN a inițiat dezvoltarea screening-ului prin RMN ca o tehnologie pentru descoperirea compuşilor modulatori cu afinitate scăzută.

În cazul screening-ului inițial, semnalele spectrului HSQC de obicei nu sunt datorate reziduurilor aminoacizilor din structura proteinelor. Astfel, informațiile obținute din SAR prin RMN sunt doar de natură calitativă, pentru a determina dacă vreun reziduu este implicat într-o interacțiune cu ligandul prezent în soluție. Pentru etapa de purificare, este important ca semnalele HSQC să fie atribuite la reziduurilor. Tehnicile de identificare a structurii proteinelor sunt tehnici de rutină în laboratoarele de RMN şi pot fi obținute în câteva zile până la câteva săptămâni pentru proteine cu o greutate moleculară mai mică de 30 kDa [Clore, Schwieters, 2002]. Astfel este posibilă cartografierea regiunii de legare în structură, la locul unde ligandul interacționează cu proteina. Deşi reziduurile care prezintă efecte la SAR prin RMN nu sunt în mod necesar în contact direct cu ligandul, modelul transformărilor chimice oferă de obicei informații importante pentru producția medicamentelor.

Exemplul din figura 9.1 va fi utilizat pentru a demonstra potențialul metodei pentru a evalua contribuția la interacțiunea cu proteina a diferitelor părți ale unui ligand. Interacțiunile domeniului SH2 cu fosfopeptide a fost inițial descris printr-un model în care peptida se leagă la fosfotirozină într-un situs/buzunar al proteinei şi cu reziduurile +1 şi +3 în al doilea situs al proteinei, înconjurat de o buclă mare. Perturbările chimice observate pentru interacțiunea ptyr sunt reprezentate cu albastru pe diagrama structurii domeniului p85 N-SH2 în figura 9.3 (A). Aceste efecte includ reziduurile Arg care coordonează inelul fosfotirozin fenil şi reziduurile înconjurătoare. Extinderea ligandului la AcpYM-NH_2 (fig. 9.3 B) arată efecte adiționale determinate de M în poziția +1 după ptyr (roşu), în timp ce multe dintre transformările chimice observate pentru ptyr sunt conservate (albastru cu valori identice ale $\Delta\delta$, azuriu cu valori $\Delta\delta$ diferite). Extinderea limitei ligandului la EEEpYMPME-NH_2 determină efecte adiționale la nivelul celui de-al doilea buzunar de legare (fig. 9.3 C).

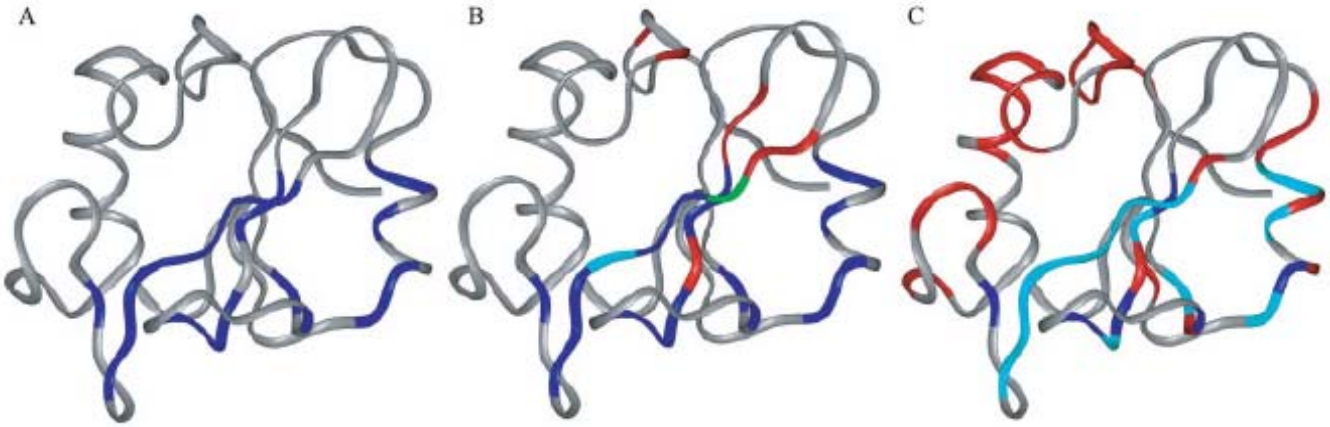


Figura 9.3 Diagramele Ribbon ale p85 N-SH2 a PI3 kinazei, codificate cu diferite culori ce indică transformările chimice pentru diferiți liganzi. (A) Ac-pY-NH_2, (B) pYM-NH_2 şi (C) EEEpYMPME. (A) Modificările chimice pentru complexul Ac-pY-NH_2-SH2. Reziduurile sunt colorate cu albastru atunci când suferă o transformare chimică a ambilor nuclei (eq. 2) de cel puțin 0,45 p.p.m. În figurile (B) şi (C), transformările chimice care nu au fost alterate comparativ cu (A) sunt marcate cu albastru, cele marcate cu roşu reprezintă noi modificări chimice neobservate pentru AcpY-NH_2, iar verdele este utilizat pentru reziduurile care au prezentat modificări chimice în (A), dar nu şi în (B) sau (C).

Câteva perturbări suplimentare sunt observate la nivelul regiunii de legare a ptyr, iar valoarea majorității transformărilor chimice la nivelul acestei regiuni este modificată comparativ cu aceea a ptyr. Extinderea modificărilor chimice pentru peptidele cu afinitate înaltă reflectă regiunile de legare unde peptidul interacționează cu proteina. În plus, modificările regiunii ptyr arată că potrivirea ptyr depinde de interacțiunile de la nivelul regiunii opuse a proteinei.

Această observație a fost ulterior confirmată prin studierea legării altor peptide şi liganzi sintetici [Gunther şi colab., 1996]. Acest exemplu demonstrează faptul că poate fi util să se înceapă cu liganzi peptidici derivați din parteneri de legare naturali. În cazul domeniului SH2, peptidul cu dimensiuni mici a fost derivat din antigenul T mijlociu. Deseori peptidele cu dimensiuni mici reprezintă puncte de start excelente pentru producerea medicamentelor. Figura 9.4 ilustrează o schemă posibilă a modului în care SAR prin RMN poate fi utilizat în cazul disponibilității unor parteneri de legare naturali.

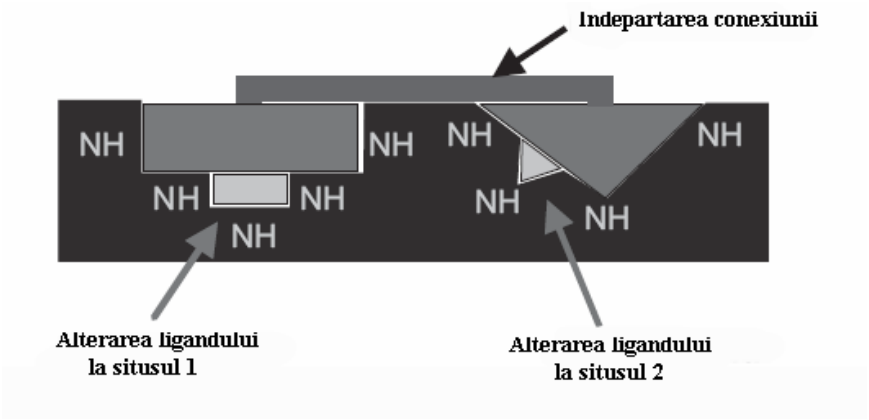


Fig 9.4 Reprezentare schematică a proiectării ligandului utilizând SAR prin RMN, pornind de la liganzii naturali ai unei proteine. Forma moleculei legate este alterată gradat la ambele situsuri de legătură, iar conexiunea este îndepărtată pentru a studia legarea independent la ambele situsuri. Un ligand cu afinitate înaltă poate fi obținut prin delimitarea celor două fragmente cu un linker alternativ.

9.2.1. Prepararea probelor

Probele proteice pentru SAR (relația structură-activitate) prin RMN trebuie să fie supraexprimate şi marcate N^{15}. Aceste caracteristici sunt obținute fie prin exprimarea proteinei utilizând lizatul algal marcat N^{15}, fie prin utilizarea mediului minimal M9 cu N^{15} H4Cl ca unică sursă de azot. Tehnicile utilizate pentru marcarea izotopică sunt discutate în capitolul 10. N^{15} H_4Cl este disponibil la un preț relativ scăzut, ceea ce permite marcarea proteică în cantități mari pentru SAR prin RMN. Probele utilizate pentru SAR prin RMN trebuie să aibă o concentrație de 0,3 mM sau peste, pentru a obține spectre HSQC bune în 10-30 de minute. Liganzii adăugați la soluția proteică trebuie să aibă o concentrație mai mare (1mM pentru fiecare ligand). Acest fapt impune tehnicii o limită deoarece concentrația totală a liganzilor nu trebuie să depăşească 5-10 mM. Astfel, numărul compuşilor este limitat la aproximativ 10 per probă. Capacitatea maximă a acestui sistem este de aproximativ 100 de probe şi 1000 de compuşi pe zi. Problemele pot apărea datorită solubilității scăzute a moleculelor organice (deseori sub 1 mM).

Soluțiile de proteine trebuie tamponate la un pH de 5-7. La valori mai mari ale pH-ului, schimbul protonilor NH cu protonii apei poate determina intensități semnificativ scăzute ale semnalului. De obicei este adăugat între 5 şi 10% D_2O la soluția proteică pentru blocarea deuteriului utilizat pentru stabilizarea câmpului

magnetic. pH-ul soluțiilor stoc de liganzi trebuie ajustat pentru a evita modificările chimice induse de pH.

De asemenea, trebuie evitată o concentrație mare de săruri în soluția de liganzi. Este recomandată prepararea soluțiilor stoc în dimetilsulfoxid (DMSO) pentru a obține concentrații de aproximativ 100 mM. Aceasta permite adăugarea de volume mici (3-5 ml) la soluția tamponată de proteine. Pentru compuşii care nu sunt solubili în apă, DMSO poate fi adăgat şi la soluția proteică. Majoritatea proteinelor sunt încă active în cazul prezenței DMSO într-un volum de 20-30% în soluția tampon.

9.2.2. Evaluarea cantitativă

9.2.2.1 Afinități de legare

Spectrele HSQC (heteronuclear single quantum spectroscopy) obținute pentru concentrații diferite ale ligandului poartă informații semnificative referitoare la afinitatea de legare locală. Nivelul transformării chimice observat în spectrul HSQC pentru o proteină titrată cu un ligand depinde de afinitatea şi de rata de reacție a ligandului. În figura 9.3, se observă modificarea poziției peak-ului (vârfului), care este tipică pentru schimbările rapide între forma liberă şi legată a proteinei.

Rata de schimb relevantă este rata disocierii (k_{off}) complexului proteină-ligand. Pentru reacțiile simple de legare de tipul P + L ↔ PL, constanta de disociere este $k_D = k_{off}/k_{on}$. În consecință, afinitatea scăzută este corelată cu rate mari. Deplasările vârfurilor la concentrații crescânde ale ligandului sunt observate numai în cazul interacțiunilor cu afinitate scăzută ($k_D > 10^{-6}$ mM).

Pentru liganzii cu afinitate crescută, în cazul cărora rata de disociere a complexului este scăzută, spectrele HSQC vor prezenta caracteristici de “schimbări lente”. În acest caz rezonanțele la nivelul proteinei libere şi noi rezonanțe apar succesiv cu transformările chimice ale complexului proteic. Acest comportament este o consecință a ratei de disociere scăzute a complexelor cu afinitate înaltă. În asemenea titrări, semnalele complexului proteic trebuie adesea reatribuite, în timp ce semnalele spectrelor cu schimburi rapide pot fi atribuite prin modificări ulterioare ale transformărilor chimice datorate adăugării subsecvente de ligand în cantități mici.

În limitarea schimburilor rapide, afinitatea de legare poate fi calculată din valoarea transformărilor chimice şi din concentrațiile corespunzătoare de ligand[1)]. Aceasta presupune ca interacțiunea să fie o reacție de legare într-o singură etapă (P + L ↔ PL). Această presupunere nu este întotdeauna valabilă. Raportări recente demonstrează că mecanismul legării ligandului la proteină poate fi conectat cu formarea intermediarilor [Gunther, Schaffhausen, 2002]. Pentru mecanisme mai complexe, parametrii de legare pot fi obținuți prin stimularea formelor semnalului în spectrul HSQC. O asemenea analiză detaliată este mult mai complexă față de o analiză de rutină în procedeele de screening. Cu toate acestea, o analiză detaliată a interacțiunilor proteină-ligand se poate dovedi benefică în procesul de îmbunătățire sintetică a producției de medicamente (Dingermann şi colab.,2004).

9.2.2.2. Determinarea structurii pe baza perturbării transformărilor chimice

SAR (relația structură-activitate) prin RMN a fost utilizată pentru evaluarea calitativă a interacțiunilor liganzilor. Cu toate acestea, s-a descris recent o abordare pe baza capaității de ancorare a proteinelor (protein docking) numită HADDOCK (high ambiguity driven protein–protein docking) care poate utiliza perturbările transformărilor chimice pentru a determina structurile complexelor proteină-proteină şi proteină-ligand (Dingermann şi colab., 2004). Această metodă a fost validată pentru două proteine diferite pentru care au fost disponibile structurile complexelor. Pentru un complex EIN-HPr, RMSD la interfața între raza X şi structura calculată prin HADDOCK a fost 2,75 Å; pentru un complex E2A-HPr, RMSD la interfață a fost 2,1 Å. În mod cert, HADDOCK este o legătură importantă între SAR prin RMN şi determinarea structurii şi oferă un acces rapid la structura complexelor proteice atunci când sunt disponibile filtrările HSQC.

1) $K_D = ([P]_0 - [PL])([L]_0 - [PL])/[PL]$, unde $[P]_0$ şi $[L]_0$ sunt concentrațiile proteinei libere şi ligandului, iar [PL] este concentrația complexului proteină-ligand. [PL] poate fi estimat din transformările chimice, care pot fi evaluate din perturbările chimice ($[PL] = |(\delta_{liber} - \delta_{obs})/\Delta\delta_{total}|$, unde δ_{liber} şi δ_{obs} sunt transformări chimice ale proteinei şi complexului la o concentrație dată a ligandului [PL], iar $\Delta\delta_{total}$ este perturbarea totală a transformărilor chimice.

9.2.3. Tehnologii avansate în SAR prin RMN

Utilizând tehnologia crioprobelor care a fost adaptată pentru aparatura RMN, concentrațiile proteinelor pot fi scăzute la 50 μM [Hajduk şi colab., 1999]. Screening-ul moleculelor mici cu ajutorul crioprobelor este posibil la concentrații de 50 μM în mixturi de 100 de compuşi, în timp ce se păstrează concentrația totală a liganzilor sub 5 mM. Această creştere de 10x a capacității creşte numărul de compuşi supuşi screening-ului la 10000 pe zi. Necesitatea solubilității scăzute a liganzilor (50-10 μM) creşte de asemenea variabilitatea compuşilor adecvați pentru screening. În plus, îndepărtarea prin tăiere a afinității pentru compuşii care pot fi detectați este redusă la $k_D \sim 0{,}15$ mM comparativ cu $k_D \sim 1$ mM la concentrații proteice mai mari. Această diferență este o consecință a cantității de proteină relativ scăzute în forma legată pentru concentrații proteice mici. Îndepărtarea prin tăiere deşi este redusă prezintă dezavantajul nedetectării compuşilor cu afinitate scăzută. Pentru HTS, rata scăzută hit reduce necesitatea mixturilor vaste de deconvoluție. Luând în considerare deconvoluția, poate fi atinsă capacitatea de 200000 de compuşi pe lună.

Experimentul RMN ce permite studiul proteinelor cu molecule mari şi a complexelor (TROSY , transverse relation optimized spectroscopy) [Hajduk şi colab., 2000] face accesibile (SAR prin RMN) proteinele de 30-50 kDa. Degenerarea transformărilor chimice devine o problemă importantă pentru proteinele mari. Utilizarea probelor cu markeri selectivi pentru aminoacizii individuali poate reduce numărul semnalelor suprapuse.

Alternativ, pentru screening-ul RMN a fost testată utilizarea proteinelor marcate C^{13} în locul celor marcate N^{15}. Această abordare este promițătoare dacă sunt marcate numai grupările metil deoarece numărul semnalelor este redus la aminoacizii care conțin grupări metil. Sunt obținute linii relativ înguste datorită proprietăților de relaxare favorabile ale carbonilor din grupările metil. În plus, intensitățile semnalului grupărilor metil sunt mai mari deoarece la semnal contribuie şi protonii. Fesik şi colab. (2000) au dezvoltat un protocol de expresie eficient utilizând precursorii marcați ai aminoacizilor [3,3'-αC]-α-cetoizovalerat şi [3-^{13}C]-α-cetobutirat.

În urma adăugării mediului de creştere, aceşti compuşi sunt transformați biosintetic, specific şi eficient, în izoleucină şi, respectiv valină/leucină. Pentru proteinele cu o greutate moleculară mai mică de 30 kDa, screening-ul bazat pe H^1-C^{13} a fost de trei ori mai sensibil decât screening-ul bazat pe H^1-N^{15} TROSY (fără utilizarea crioprobelor), cu spectre ale probelor cu concentrația de 50 μM obținute în aproximativ 10 minute. Prin utilizarea crioprobelor, a devenit accesibilă utilizarea concentrațiilor de 15 μM pentru proteinele mici. Pentru proteinele cu o greutate moleculară peste 40 kDa, abordarea bazată pe C^{13} a fost mult mai sensibilă decât TROSY, dar insuficientă pentru screening. Screening-ul proteinelor mai mari devine practicabil când probele sunt perdeuterizate protonii ne-schimbabili sunt înlocuiți cu H^2 . Pentru proteinele marcate H^2-C^{13} cu o greutate moleculară de aproximativ 120 kDa, spectrele H^1-C^{13} ale proteinelor cu concentrații de 0,3 mM au fost obținute în 30 de minute prin tehnologia ce utilizează crioprobele.

Fesik (2000) raportează că marcarea cu C^{13} prin utilizarea [3,3'-αC]-α-cetoizovaleratului şi [3-C^{13}]-α-cetobutiratului este aproape la fel de eficientă din punct de vedere al costului ca şi marcarea cu N^{15} şi mult mai puțin costisitoare decât utilizarea marcării uniforme cu C^{13} sau marcări metil-C^{13} prin utilizarea [U-C^{13}]-α-cetoizovaleratului şi [3-C^{13}]-α-cetobutiratului. Sinteza proteinelor în afara celulelor poate deveni o alternativă interesantă pentru protocoalele complexe de expresie dacă aminoacizii marcați pot fi produşi cu costuri mici.

9.2.4. Evaluarea datelor

Interpretarea screening-ului actual prin utilizarea a mii de spectre necesită software-uri care pot vizualiza modificări ale spectrelor într-o manieră grafică simplă. Spectrele suprapuse şi inspecția manuală sunt impracticabile pentru cantități mari de date. Sunt necesare metode de analiză mai sofisticate.

Cel mai comun mecanism utilizat pentru studiul variațiilor în serii de spectre este utilizarea analizei componentului principal (PCA). PCA este o metodă statistică clasică utilizată pentru a reduce dimensiunea problemelor şi pentru a transforma coordonatele interdependente în coordonate semnificative şi independente. PCA

transformă datele originale (intensitățile şi pozițiile semnalului într-un spectru) într-un set de „scoruri” pentru fiecare probă, măsurate în funcție de axele componentelor principale. Scorurile componenteler principale înlocuiesc variantele originale şi sunt corelate cu componentele principale succesive contorizând descreşterea variației şi ortogonal, fară nicio corelație între scorurile diferitelor axe. Ca o consecință a acestor proprietăți, un număr mic de componente principale pot înlocui variabilele originale fără o pierdere importantă de informații.

Diagramele de împrăştiere (scatter plot) ale scorurilor primelor componente principale utilizate oferă un mijloc excelent de a vizualiza şi uneori de a arăta adunarea la un loc a probelor similare, separarea tipurilor diferite de probe sau prezența selecției probelor cu valori diferite. Diagramele pot fi utilizate pentru a explora care dintre compuşi este mai implicat în separarea probelor în grupuri: cei mai importanți compuşi tind să corespundă celor mai mari valori absolute. De obicei primele patru componente principale sunt importante. Figura 9.5 prezintă o diagramă de împrăştiere tipică obținută pentru 92 de spectre ale SAR prin RMN pentru factorul declanşator al *Mycoplasma genitalium* [23]. Spectrele se împart în trei clase.

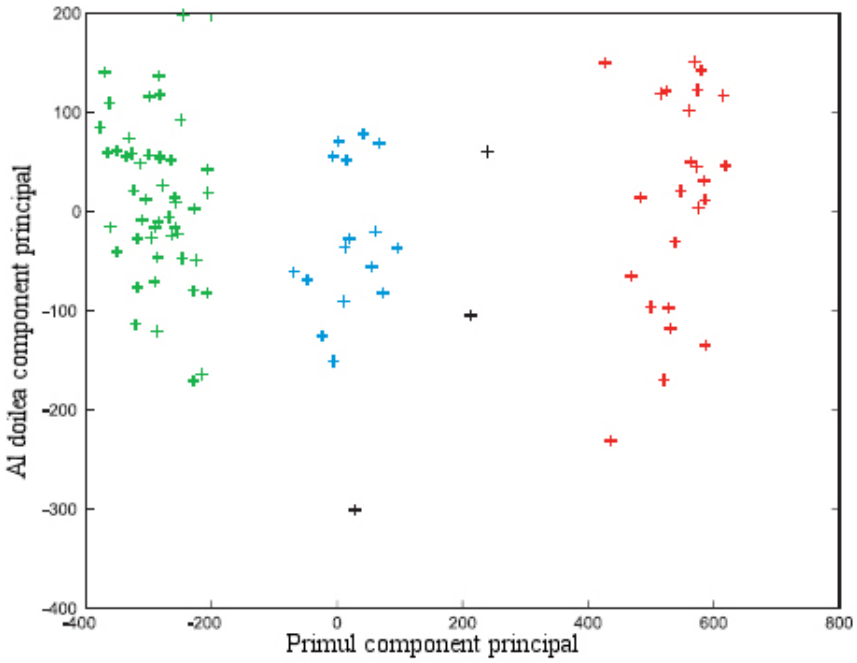


Figura 9.5 Diagrama primului component principal în comparație cu cel de-al doilea pentru spectrele 92 HSQC înregistrate pentru factorul declanşator al *M. genitalium*. Cele patru grupuri înregistrate prin PCA sunt marcate cu verde, albastru, negru şi roşu.

A fost posibilă segregarea grupurilor de liganzi în diagramele componentelor principale care prezintă efecte specifice de legare şi efecte legate de pH. Din păcate, PCA este sensibilă la toate tipurile de modificări dintr-un spectru, incluzând artefactele liniei de bază şi modificări ale intensității semnalului.

Evaluarea SAR prin RMN în stadiul de purificare a ligandului este de obicei facilă. Când liganzii sunt titrați în soluția proteică, deplasarea gradată a semnalului şi perturbările transformărilor chimice pot fi atribuite unor modificări subtile în structura ligandului.

9.3. Monitorizarea moleculelor mici

În plus față de metodele bazate pe spectrele RMN ale proteinelor, au fost dezvoltate numeroase tehnici bazate pe spectrele liganzilor. Multe dintre aceste tehnici depind de condițiile schimburilor rapide între proteină şi ligand. În cazul schimburilor rapide şi cu un exces de ligand, rezonanțele ligandului în soluție vor prezenta parțial proprietățile spectrale ale ligandului legat la proteină. [2)]

O proprietate spectrală care este transferată rapid este lățimea liniei rezonanței. Semnalul ligandului legat la proteină va fi lărgit deoarece semnalele proteinelor au o lățime mai mare decât aceea a moleculelor mici de ligand. Lățimea mare a liniei semnalului proteic este o consecință directă a timpului de autocorelare al proteinelor în soluție.[3)] În acelaşi mod, transferul unor proprietăți de relaxare tipice pentru proteinele mari, a fost utilizat pentru studierea interacțiunilor şi pentru screening-ul legării ligandului. Cele mai utilizate tehnici pentru observarea rezonanțelor ligandului sunt bazate pe transferul magnetizării prin efectul nuclear (nuclear Overhauser effect – NOE – transferul polarizării de spin de la o populație de spin la alta prin intermediul cross-relaxării). Aceste tehnici nu necesită marcarea izotopică a proteinei, cantitatea de proteină necesară este de obicei foarte mică şi nu există o limită superioară a mărimii proteinei.

2) Pentru schimburile rapide şi populații egale, rata schimburilor trebuie să fie $k/\Delta v > \pi/\sqrt{2}$, unde k este rata interacțiunii , iar Δv este diferența transformărilor chimice a statusului legat şi liber al ligandului. Pentru interacțiunile proteină-ligand, rata care determină schimburile cu rate rapide este rata interacțiunii proteină-ligand ($P+L \leftrightarrow PL$).

3) Rata relaxării transverse R_2 este mare pentru proteinele cu masă moleculară mare cu timpi de corelație crescuți τ_c. Lățimea liniei LW este direct proporțională cu rata relaxării ($LW=R_2/\pi$)

În schimb, trebuie utilizate soluții relativ pure deoarece orice impuritate contribuie la semnal. Din păcate, liganzii cu afinitate foarte mare au rate de disociere din complex foarte mari şi sunt înregistrați ca nelegați. Experimentele competiționale pot ajuta la rezolvarea acestei probleme.

Un alt factor limitator este solubilitatea ligandului deoarece multe dintre aceste metode necesită un exces de ligand. Unele dintre aceste metode sunt utile pentru HTS, unele oferă informații mai detaliate referitoare la legarea ligandului, iar altele pot fi utilizate pentru cartografierea epitopilor de legare ai ligandului. Metodele bazate pe relaxare vor fi descrise pe scurt, în timp ce tehnicile ce implică transferul magnetizării vor fi descrise în detaliu.

9.3.1. Metode de relaxare

În spectroscopia RMN, termenul relaxare este utilizat pentru a descrie procesul care restaurează magnetizarea de echilibru şi faza aleatorie. Trebuie distinse două mecanisme de relaxare, relaxarea transversă şi longitudinală, cu ratele de relaxare R_2 şi R_1. Relaxarea transversă poate fi asociată cu fluctuații ale câmpului electric cu originea în dezordinea completă (overall tumbling) şi în mişcările din interiorul moleculei. Din moment ce moleculele mari se mişcă lent în soluție, timpul de corelație a mişcării de rotație este relativ lung, cauzând rate de relaxare R_2 mari şi de asemenea lățimi mari ale liniilor semnalelor RMN (LW = R_2/π). Compuşii care interacționează cu un receptor cu greutate moleculară mare prezintă linii lărgite şi valori R_2 crescute. O descriere mai detaliată a teoriei relaxării depăşeşte obiectivul acestui capitol [vezi Fischer şi colab., 1998].

Un ligand legat la o proteină adoptă proprietățile de relaxare ale complexului. În cazul schimburilor rapide, moleculele libere de ligand păstrează pentru scurt timp proprietățile de relaxare ale statutului de ligand legat. Trebuie să existe un exces de ligand pentru a observa semnalele ligandului. Lărgirea rezonanțelor este o proprietate tipică a spectrelor moleculelor mici în prezența proteinelor mari. Acest lucru este reflectat în rate de relaxare transverse mai mari. Pentru acest motiv, lățimea liniei şi rata de relaxare transversă pot fi utilizate drept criterii pentru screening-ul liganzilor.

Lărgirea este mai pronunțată pentru proteine mari sau pentru proteine legate la matrix. Liganzii legați pot fi identificați prin experimente cu filtru T_2. De obicei, trebuie comparate spectrele cu şi fără proteine.

Lărgirea semnalelor liganzilor indusă de legarea la o proteină a fost utilizată frecvent în trecut. Sykes şi colab. (1994) au studiat interacțiunea domeniului extracelular de 85-kDa al receptorului factorului de creştere epidermal (EGFR-ED) cu factorul de creştere transformant α (TGF-α).

Linia protonilor metil a prezentat o dependență regională ce indica regiunea TGF-α implicată în reacție. Acest studiu arată că această tehnică oferă informații importante pentru o descriere detaliată a interacțiunilor proteină-ligand.

Potențialul de editare a relaxării pentru screening a fost demonstrat de Fesik şi colab. (1997) prin utilizarea FKBP şi un amestec de nouă compuşi din care a fost identificat un ligand cu o constantă de disociere de 200 μM. Această metodă nu este practică pentru screening-ul eficient al liganzilor deoarece trebuie utilizate diferențele între spectre cu şi fără ligand pentru a obține rezultate relevante. T_2 şi $T_{1\rho}$ au fost utilizate pentru a filtra componentele spectrale ce rezultă din durate de relaxare scăzute . Stockmann, Dalvit, (2002) au descris o gamă variată de metode de relaxare, incluzând relaxarea longitudinală, relaxarea transversă în prezența spinilor marcați şi relaxarea cu cuantuum dublu.

9.3.2 Metode de difuzie

Tehnicile de difuzie se bazează pe faptul că difuziunea translațională depinde de mărimea proteinei. Conform ecuației Stokes-Einstein $D = kT/6\pi\eta r$, unde k este constanta Boltzmann, T este temperatura, η este vâscozitatea şi r este raza moleculei, coeficientul de difuzie depinde invers proporțional de mărimea moleculei. Acest principiu a fost utilizat pentru a analiza amestecuri de compuşi în cadrul chimiei combinatorii. Shapiro şi colab. (1996) au combinat tehnicile de editare cu spectrele TOCSY pentru a obține spectre 2-D cu suprapunere mică a vârfurilor şi informații valoroase asupra structurii liganzilor (DECODES, spectroscopia de difuziune codificată).

Coeficienții de difuzie sunt măsurați prin RMN prin aplicarea pentru timp scurt a unui gradient de câmp magnetic liniar. Acest gradient aplică câmpuri magnetice diferite la diferite poziții ale probei şi astfel apare defazarea spațială a semnalului care poate fi inversată prin aplicarea aceluiaşi gradient codificat spațial după echo-spin. Refazarea nu este aplicabilă pentru moleculele care s-au mişcat de la aplicarea primului gradient. În consecință, moleculele mari cu coeficienți de difuzie mici vor fi afectate într-un grad mai mic de filtrul de difuzie decât moleculele mici. Coeficientul de difuzie poate fi determinat prin măsurarea intensităților semnalelor în funcție de timpul de difuzie şi tăria gradientului.

În cazul schimbărilor rapide, ligandul liber poate exprima proprietăți de difuzie ale complexului. În principiu, au fost utilizate două tipuri de experimente de difuzie, PFG-SE (pulsed field gradient spin-echo) şi PFG-STE (pulsed field gradient stimulated-echo). Pierderea magnetizării datorată relaxării transverse este redusă în ultimul caz. PFG-SE are dezavantajul că este observată numai o jumătate din semnal. O secvență cu gradiente bipolare şi o întârziere a curentului turbionar sunt frecvent utilizate pentru a minimaliza artefactele turbionare.

Pentru moleculele mici legate la molecule mai mari, coeficientul de difuzie este redus în comparație cu moleculele cu mărimi similare, dar care nu se leagă. Coeficienții de difuzie observați vor fi calculați în funcție de rata de schimb. Shapiro şi colab. (1997) au utilizat expresia „afinitate RMN” pentru această abordare deoarece aminteşte de separarea cromatografică pe baza afinității. Shapiro a utilizat afinitatea RMN pentru quinină cu un amestec de nouă compuşi din care a putut fi selectat unul prin analiza spectrelor 1-D şi experimente 2-D DECODES.

De asemenea, Shapiro (1998) a aplicat afinitatea RMN pentru a studia legarea tetrapeptidelor la glicopeptidul vancomicina şi pentru a studia legarea moleculelor mici la ADN. În aceste cazuri raportate ligandul şi proteina au fost prezente în cantități echimolare la concentrații de 0,5-1 mM. S- a demonstrat că difuzia RMN poate fi utilizată pentru cartografierea epitopului de legare; aceasta se bazează pe faptul că magnetizarea longitudinală în experimentele STE este supusă relaxării încrucişate între proteină şi ligand.

Prin NOE, magnetizarea e transferată între protoni şi complex. Acest efect induce modificări ale intensității semnalului atunci când se aplică intensități scăzute şi înalte ale gradientului pentru un timp de difuzie îndelungat, deoarece intensitățile semnalului scad cu rate diferite în timpul perioadei de difuzie. Analizele cantitative au fost realizate prin diagramele intensității semnalului pentru gradientul pătrat g^2.

Hajduk a propus utilizarea diferențelor între variate spectre pentru a preveni problemele care provin din lărgirea semnalului ligandului şi din semnalele de fundal ale proteinei. În prima etapă, spectrele STE ale amestecului de compuşi în prezența proteinei la gradient înalt şi scăzut s-au diminuat. Rezultatul a fost scăzut din nou din spectrul STE al amestecului de compuşi în absența proteinei, înregistrat la gradient scăzut. Rezultatul este un spectru care prezintă numai semnalele moleculelor mici care se leagă la proteină. Această abordare dificilă, care necesită trei spectre diferite a fost adecvată pentru identificarea unui inhibitor cu concentrația 20 μM al stromelisinei dintr-un amestec de nouă compuşi. Această abordare este limitată de asemenea deoarece liganzii legați pot avea transformări chimice diferite la schimburi rapide atunci când se utilizează cantități egale de proteină şi ligand.

Difuzia RMN poate fi utilizată pentru determinarea directă a afinității liganzilor fără a fi necesară titrarea cu liganzi. Pentru ligandul legat şi cel liber pentru schimburi rapide, coeficientul de difuzie observat este o medie în funcție de timp a speciilor legate şi libere. Fracția ligandului legat poate fi obținută din constantele de difuzie ale proteinei $D_{legat,}$ ale ligandului liber D_{liber} şi a ligandului în amestec prin ecuația $D_{obs} = x_{liber}D_{liber} + x_{legat}D_{legat,}$ presupunând constante egale ale complexului şi ale proteinei libere.

Experimentele de difuzie sunt importante în screening-ul medicamentelor şi, într-un grad limitat, pentru cartografierea epitopilor. Principalul dezavantaj este sensibilitatea relativ scăzută a experimentului care necesită cantități echimolare ale proteinei şi ligandului la concentrații de aproximativ 50 μM. Chiar şi cantități mai mari de substanțe sunt necesare pentru compuşii cu afinitate scăzută deoarece efectul de difuzie devine foarte mic.

9.3.3 Metode care implică transferul magnetizării

9.3.3.1 NOE transferat (TrNOE)

Efectul TrNOE a fost inițial descris de către Bothner-By (1972). Peters (1997) a propus utilizarea TrNOE pentru screening-ul compuşilor în amestec. TrNOE combină NOE între spini adiacenți ai ligandului cu schimburi chimice între ligandul liber şi legat.[4)] Moleculele mici induc NOE pozitive; moleculele mari induc NOE mari cu o magnitudine mai mare. Când un ligand îşi schimbă rapid starea între stare legată şi nelegată, el poate transfera NOE de la complexul proteic la populația de molecule libere. În spectrul NOESY, semnalele negative apar de la liganzii care se leagă la proteină, în timp ce semnalele de la compuşii slab legați sunt pozitive sau dispar.

Este bine înțeleasă dependența cantitativă a efectului TrNOE de timpul de amestec, cantitatea ligandului legat, şi timpii corelației libere şi legate a proteinei şi ligandului. TrNOE sunt obținute din spectre NOESY obişnuite. Semnalele proteinelor nu sunt de obicei observate pentru proteinele mari. Semnalele de fundal ale proteinei pot fi supresate prin filtre T_2 sau T_1.

Peters şi colab. (1999) au utilizat măsurătorile TrNOE pentru screening-ul oligozaharidelor pentru E-selectina deglicozilată/imunoglobulina umană G. Inițial spectrele NOESY ale amestecului de liganzi au fost înregistrate la temperaturi diferite până când toate semnalele NOE au fost pozitive. Amestecul de compuşi a prezentat NOE negative în prezența proteinei. Opt compuşi au putut fi excluşi pe baza absenței semnalelor TrNOE-NOE în regiuni caracteristice ale spectrului. Din cei doi compuşi rămaşi, a fost identificat un un sialil Lewis_x mimetic, a cărui conformație bioactivă a fost determinată din TrNOESY. Identificarea epitopilor de legare a fost împiedicată de spinul puternic al difuziei care distribuie magnetizarea asupra tuturor protonilor compusului. Peters şi colab. (2000) au utilizat experimentul 3-D TOCSY-TrNOESY într-o mixtură de 15 carbohidrați. Deşi această abordare mai laborioasă este utilă pentru a separa amestecurile de compuşi, nu este adecvată screening-ului.

4) Efectul NOE este bazat pe corss-relaxarea longitudinală dipol-dipol a spinilor adiacenți. De obicei semnalele sunt observate pentru protonii aflați la o distanță mai mică de 6Å.

Metoda TrNOE este larg aplicabilă pentru proteinele mari cu constante de disociere între 10^{-7} şi 10^{-3}. Dezavantajele acestei metode sunt legate de necesitatea unor concentrații relativ mari de ligand, ceea ce presupune compuşi foarte solubili, timpi de înregistrare prelungiți şi valori mari ale difuziei spin, care nu permit cartografierea epitopilor.

9.3.3.2. Transferul saturației (STD)

STD-RMN (experimente care detectează magnetizarea transferată de la o proteină la ligandul legat) asigură o îmbunătățire a TrNOE înlăturând multe din deficiențele acesteia. Deşi efectul STD este cunoscut de mult timp, abia recent a fost utilizat pentru screening-ul liganzilor.

Principiul STD-RMN este ilustrat în figura 9.6. Inițal rezonanța protonică a proteinei este saturată. Pentru molecule mari, efectul de saturație se distribuie repede la întreaga proteină prin tranziția de flip-flop a energiei între protoni adiacenți.[5)] Transferul magnetizării la ligadul legat cauzează saturații diferite ale reziduurilor de liganzi. Este important ca gradul de saturație să afecteze numai rezonanța proteinei, nu şi rezonanța ligandului. Aceasta garantează că transferul saturației provine de la proteină, nu de la rezonanțele din ligand. Tipic, rezonanțele metil cu transformări chimice sub 0 ppm sunt saturate.

Într-un experiment de referință, gradul de saturație este aplicat la o frecvență la care nu rezonează niciun proton al proteinelor sau liganzilor (tipic, 30 ppm). Acest spectru de referință nu prezintă niciun efect al saturației.

Pentru a minimaliza scăderea artefactelor, diferența dintre cele două spectre este obținută prin măsurarea alternărilor rezonanței on- off- care sunt adăugate utilizând un ciclu de fază. Programul utilizat pentru aceste două experimente este reprezentat schematic în figura 9.7 Semnalele de fundal ale proteinelor pot fi îndepărtate prin aplicarea unui *spin-lock pulse* care acționează ca un filtru $T_{1\rho}$.

5) Rata tranzițiilor flip-flop responsabile pentru distribuția efectului de saturație la nivelul proteinei este direct proporțioală cu timpul de corelație τ_c al proteinei. Din acest motiv, saturația se distribuie mai rapid în moleculele mari. Tipic, sunt aplicați timpi de saturație de 2 s.

Meyer şi colab. (1999) au determinat gradul saturației în funcție de excesul de ligand prin legarea *N*-acetilglucozaminei la aglutinina germenilor de grâu. Efectul de saturație creşte cu rata concentrației proteinei şi ligandului. Creşterea a fost observată peste rata de 210:1. Un efect STD suficient de puternic a fost observat la o rată de 60:1. Rate rapide de disociere favorizează efecte STD mari. Necesitatea unui exces de ligand permite măsurările STD la o concentrație scăzută a proteinei. Utilizând un exces de 1igand de 100 de ori, şi o soluție de ligand 1 μM, concentrația proteinei poate fi de 10 nM.

Principiul STD poate fi combinat cu experimente 2-D homonucleare şi hetereonucleare. STD-TOCSY a fost prezentat de Meyer şi colab. (2001) prin utilizarea unui amestec de şapte oligozaharide şi aglutinina germenelui de grâu. La oligozaharidele cu şase subunități glucidice, grupuri diferite au arătat efecte STD semnificativ diferite. Acei protoni ai glucidelor care sunt în contact direct cu proteina au un grad mai mare de saturație. Vogtherr (2000) a utilizat corelația STD-heteronucleară multi-cuantum (STD-heteronuclear multi-quantum correlation - HMQC) pentru a obține o bancă de oligozaharide. Potențialul STD-RMN pentru cartografierea epitopilor a fost recent demonstrat pentru legarea metil *β*-D-galactozidului la o lectină de 120-kDa, aglutinina. Diferențe mari ale intensității au fost observate pentru diferiți protoni ai metil *β*-D-galactozidului, indicând contribuția lor diferită la interacțiunea cu proteina. În aceeaşi lucrare, au fost realizate studii de competiție, ceea ce a făcut STD-RMN accesibil la liganzi cu constante de disociere nanomolare şi rate de disociere scăzute. STD-RMN a fost de asemenea utilizat în asociere cu HR-MAS (un tip de RMN caracterizat prin prezența interacțiunilor anizotropice).

Un exemplu de spectru este prezentat în figura 9.8, unde un compus fenolic a fost legat la o dehidogenază. Spectrul din figura 9.8 (A) reprezintă spectrul STD înregistrat la saturația de -0,45 p.p.m (săgeata). Figura 9.8 (B) prezintă un spectru de referință al aceluiaşi compus. Spectrele sunt reduse la o scală la intensități egale ale semnalelor aromatice la aproximativ 7 ppm. Semnalele alifatice la 3,8, 2,2 şi 2 ppm au o intensitate relativ redusă. Rezultatul este în conformitate cu supoziția că

gruparea fenil este forța motrică pentru interacțiunea cu proteina. Figura 9.8 (C) este controlul negativ, care nu prezintă nicio proteină în amestec. Spectrul a fost înregistrat la aceeaşi parametrii ca şi spectrul STD din figura 9.8 (A).

Dezavantajul STD-RMN este timpul de înregistrare dublat şi faptul că liganzii care se leagă strâns sunt înregistrați ca nelegați, determinând rezultate fals negative ale screening-ului. Necesitatea unui exces de ligand limitează STD-RMN la compuşii solubili (peste 10 mM). Pentru a evita eliminarea artefactelor, spectrometrul şi probele inițiale trebuie calibrate cu grijă prin noile metode.

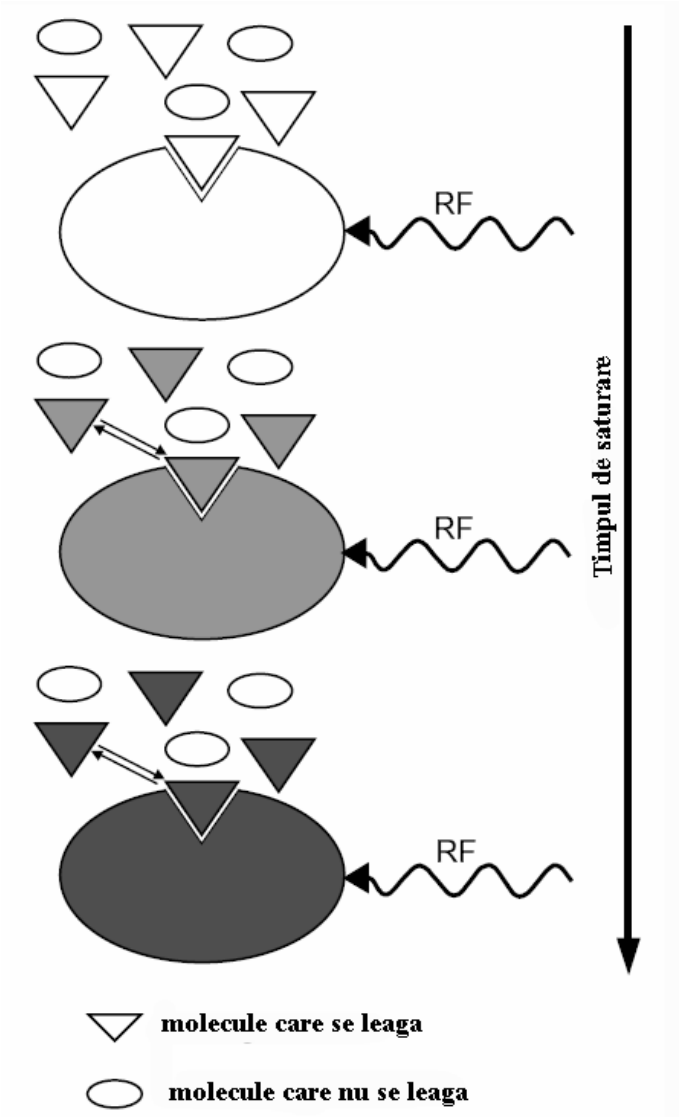


Fig. 9.6 Ilustrare schematică a experimentului STD-RMN. Rezonanțele proteinelor sunt saturate selectiv fără a afecta rezonanțele ligandului. Saturația crescătoare este reprezentată prin tonuri mai închise de gri. Compuşii care interacționează cu proteina (triunghiuri) vor prezenta efectul saturației. Moleculele mici care sunt eliberate în rate de schimburi rapide între complex şi ligandul liber pot fi detectate ulterior. Moleculele care se leagă la proteină au intensități ale semnalului mai reduse, ca o consecință a transferului saturației. Moleculele care nu se leagă (ovale) nu prezintă niciun efect.

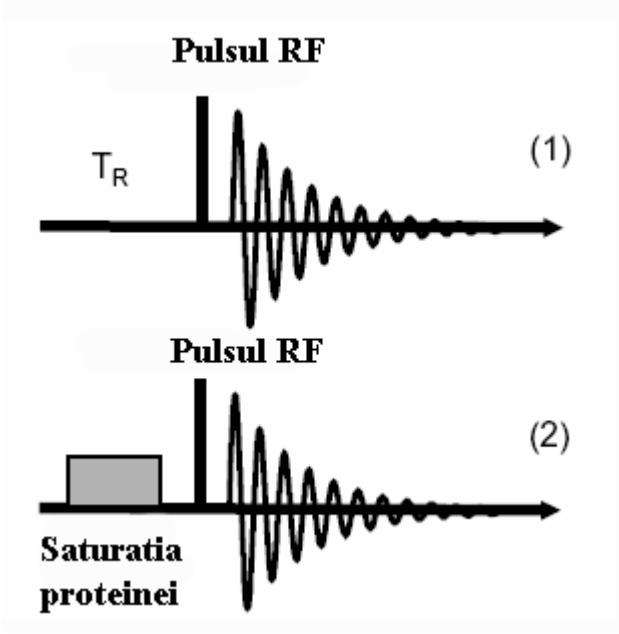


Fig. 9.7 Reprezentare schematică a secvenței pulsului utilizat pentru STD-RMN. Sunt evidențiate două spectre, unul cu şi celălalat fără saturația rezonanțelor proteice.

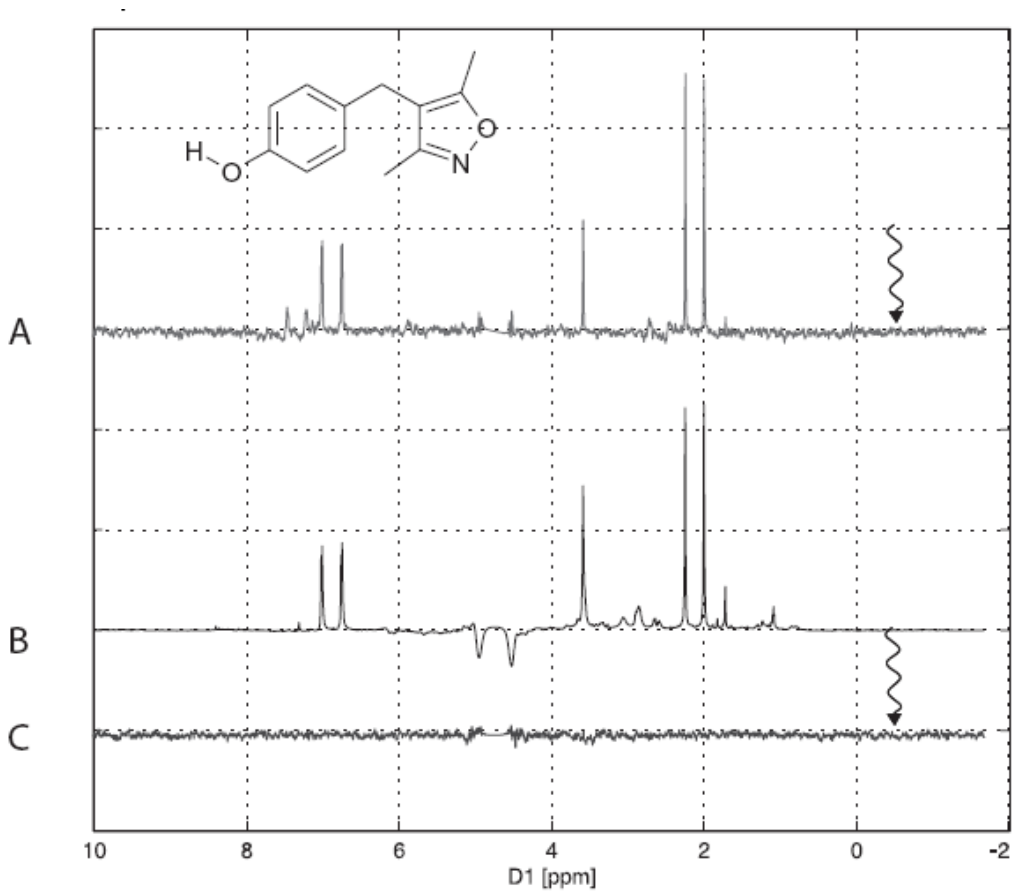


Fig. 9.8 (A) Spectrul STD-RMN al unui compus fenolic legat la dehidrogenaza de 72-kDa. (B) Spectrul de referință al aceluiaşi compus. (C) Spectrul STD-RMN de control fără nicio proteină prezentă în soluție.

9.3.3.3. Pomparea NOE (NOE pumping)

Pomparea NOE este în strânsă legătură cu STD-RMN. În STD-RMN, saturația este transferată la ligand; în pomparea NOE, magnetizarea e transferată de la proteină la ligand. Magnetizarea poate fi de asemenea transferată de la ligand la proteină într-un experiment numit pomparea inversă a NOE (RNP). Pentru pomparea NOE, semnalele proteinelor sunt selectate printr-un filtru de difuziune care anulează semnalele ligandului. Magnetizarea este transferată în timpul amestecului prin cross-relaxarea intermoleculară. Sunt detectate moleculele de ligand cu schimburi rapide care au fost supuse transferului magnetizării de la proteină. Toate celelalte molecule nu au semnal. Aceasta a fost evidențiată utilizând albumina serică umană şi un amestec de trei compuşi – acidul salicilic, acidul L-ascorbic şi glucoza. În spectrul pompării NOE au fost observate numai semnalele acidului salicilic [Chen, Shapiro, 1998]. Acest ligand nu a fost detectat într-un experiment pur de difuzie fără transferul NOE.

Spectrul ligandului dintr-un experiment revers-NOE este selectat prin intermediul filtrului de relaxare transversă care elimină semnalele proteinei şi inversează semnalele ligandului. Acest filtru exploatează timpul de relaxare mult mai rapid al proteinei - T_2, comparativ cu timpul mult mai lent al ligandului. Pe parcursul timpului de amestec, magnetizarea ligandului este parțial transferată la proteină via cross-relaxarea intermoleculară. Este retras/scăzut un experiment de referință în care nu se realizează niciun transfer al magnetizării. În spectrul diferențial sunt observate numai acele semnale ale compuşilor care interacționează cu proteina. Acest experiment a fost utilizat pentru albumina serică umană şi glucoza şi un amestec de acizi graşi neramificați ca presupuşi liganzi. În spectrul diferențial au fost observați numai acizii graşi. Ratele intensității între diferiți liganzi au fost utilizate pentru a ordona afinitățile diferiților compuşi [Chen, Shapiro, 2000]. Din cele două experimente, revers pomparea NOE este cel mai sensibil.

Pomparea NOE şi RNP sunt considerate experimente foarte sensibile pentru screening-ul RMN primar. Cartografierea epitopilor este limitată de difuzia spin.

9.3.3.4. WaterLOGSY şi ePHOGSY

WaterLOGSY utilizează molecule de apă legate la interfața proteină-ligand pentru a transfera magnetizarea de la proteină la ligand. Apa de la interfață poate fi implicată în realizarea legăturilor între proteină şi ligand. Este de asemenea posibil ca hidratarea hidrofobă la suprafața proteinei în vecinătatea ligandului, să aibă rol de transmițător. Timpul de rezidență a moleculelor de apă în cavitățile proteinei variază de la câteva nanosecunde până la câteva sute de microsecunde [Denisov, Halle, 2002]. Acest timp este suficient de lung pentru a se realiza NOE şi suficient de scurt pentru a menține rezonanțele apei la schimburi rapide atunci când este observat un singur semnal pentru rezonanțele apei libere şi legate. Principiul waterLOGSY este ilustrat în figura 9.9. NOE transferă magnetizarea de la apă la proteină. Semnul acestei magnetizări este neschimbat de la magnetizarea inițială.

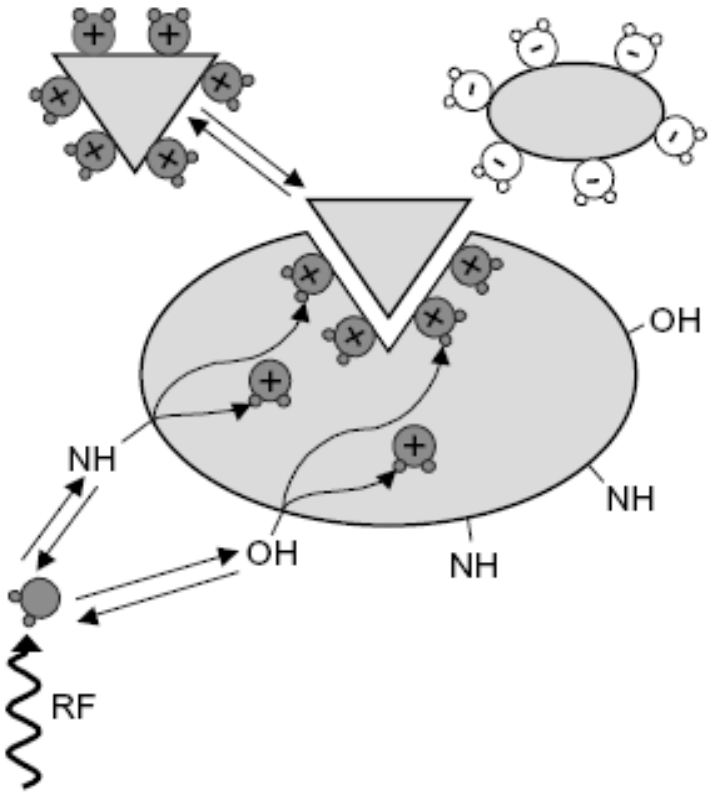


Fig 9.9 Ilustrare schematică a experimentului ePHOGSY. Magnetizarea este transferată de la apă la protonii proteinei prin NOE sau prin schimbul protonilor labili indicați prin săgeți. Ligandul din soluție prezintă un transfer al magnetizării de la apă. Semnul semnalului diferă pentru moleculele care se leagă la proteină (+) şi acelea care transferă magnetizarea fără a se lega la proteină (-).

Alt mecanism pentru transferul magnetizării de la apă la proteină este schimbul chimic al protonilor apei cu protonii labili ai proteinei. Acest proces conservă semnul magnetizării; aceste două procese sunt asociate la transferul magnetizării de la apă la proteină. În etapa a doua, are loc NOE dintre apa legată şi protonii ligandului. NOE este negativ pentru protonii care cad lent din complexul proteină-ligand, şi pozitiv şi cu magnitudine scăzută pentru moleculele mici precum ligandul liber din soluție. Din moment ce în experiment este utilizat un exces de ligand, întotdeauna semnalul observat este cel al ligandului. În funcție de constanta de disociere a complexului, va domina fie contribuția NOE negativ tipic pentru proteină sau NOE pozitiv al moleculelor mici. Aceasta permite o distincție rapidă între moleculele care se leagă la proteină şi acelea care nu se leagă deoarece NOE al celor două va avea semnale diferite în spectru.

Cel mai eficient experiment utilizat pentru evaluarea efectului waterLOGSY este denumit ePHOGSY [Dalvit, 1998]. Acest experiment începe cu inversia selectivă a rezonanțelor protonilor apei şi defazarea celorlalte rezonanțe. NOE al protonilor proteinei şi ligandului se formează din protonii selectați ai apei. Experimentele de titrare a ligandului au fost realizate pentru a deriva constantele de legare [Dalvit şi colab., 2001] prin experimente ePHOGSY. Potențialul waterLOGSY a fost demonstrat pentru albumina serică umană în prezența triptofanului şi pentru kinaza 2 ciclin-dependentă (cdk2) care leagă doi liganzi de natură necunoscută [Dalvit şi colab., 2001]. Un experiment ePHOGSY pentru dehidrogenaza legată la la 4-*n*-butil fenol este reprezentat în figura 9.10. Amestecul conține de asemenea imidazol şi DMSOs nicio interacțiune cu proteina şi, în consecință, niciun semnal negativ nu a fost observat.

Experimentele ePHOGSY au potențial pentru screening-ul RMN. Experimentul este foarte sensibil, lipsit de de artefacte, şi necesită concentrații mici de proteină şi ligand. Semnalele liganzilor nelegați sunt de semn opus față de semnalele liganzilor care se leagă cu afinitate crescută. Constanta de disociere a complexelor poate fi de 0,1 μM. Din păcate, această metodă nu poate fi utilizată pentru cartografierea epitopilor deoarece intensitatea semnalelor este o funcție

complexă a timpului de rezidență a apei şi a distanței dintre protonii ligandului şi ai moleculei de apă. Cu toate acestea, este o metodă foarte sensibilă pentru screening-ul ligandului.

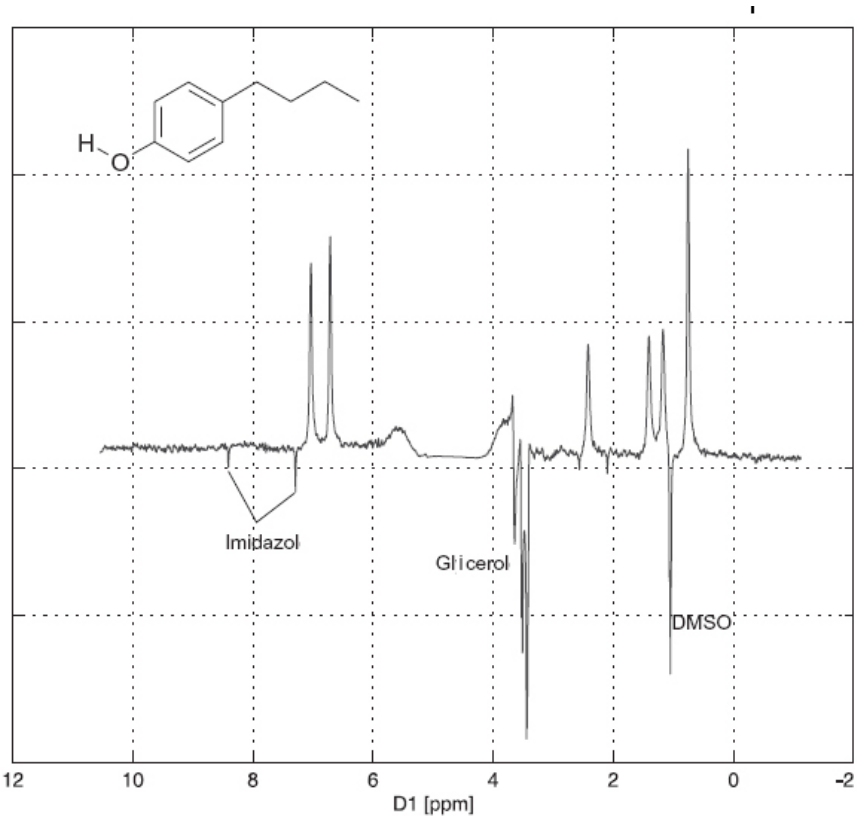


Fig. 9.10 Un experiment ePHOGSY pentru dehidrogenaza legată la 4-*n*-butil-fenol

9.3.4. Prepararea probelor

În comparație cu probele de proteine utilizate pentru SAR prin RMN clasic, probele utilizate în tehnicile de detecție a ligandului trebuie să aibă caracteristici speciale. Evident, nu este necesară marcarea izotopică şi nici supraexpresia proteinei. Chiar şi purificarea proteinei este necesară doar dacă substanțele analizate se leagă de oricare altă proteină din soluție. Orice alte restricții sunt mai dificile, luând în considerare pH-ul soluției deoarece nu sunt examinați protoni labili. Cu toate acestea, poate interfera cu prezența moleculelor mici, altele decât liganzii de interes. Un exemplu tipic, glicerolul, deseori utilizat în concentrații mari pentru a stabiliza proteinele, determină rezonanțe de mare intensitate care pot acoperi alte semnale care se află dedesubt.

Necesitatea de a evita semnalele altor compuşi impune o restricție stringentă în alegerea soluțiilor tampon fără protoni nelabili. Pot fi utilizate soluțiile tampon cu protoni labili cu schimburi rapide cu apa, precum fosfatul şi hidrogenul carbonat.

Moleculele mici sunt deseori dizolvate în DMSO şi adăugate în cantități mici din soluțiile stoc de DMSO (câțiva microlitri). În particular, pentru compuşii relativ insolubili, creşterea solubilității poate fi obținută atunci când solventul conține DMSO. Majoritatea proteinelor îşi păstrează funcția în soluțiile apoase cu concentrații ale DMSO de 20-30%. Pentru acest scop trebuie utilizat DMSO deuterizat. În acelaşi mod, pot fi adăugați alți solvenți deuterizați. În cazul d^6 – DMSO, este observat un semnal DMSO rezidual ascuțit, mic, la 2,2 ppm care este deseori o referință pentru substanțele nelegate. Tetrametilsilanul (TMS) sau acidul 2,2-dimetil-2-silapentan-5-sulfonic (DDS) pot fi adăugate ca standarde pentru transformările chimice.

9.4. Concluzii

În ultimii ani, metodele RMN au pătruns în domeniul sistemelor de analiză de mare capacitate (HTS) al compuşilor ca liganzi ai proteinelor. Această dezvoltare este uimitoare, luând în considerare sensibilitatea relativ scăzută a experimentelor RMN de bază, comparativ cu metodele ce prezintă o sensibilitate ridicată precum spectroscopia cu fluorescență. Dezvoltarea recentă a hardware-ului a jucat în mod sigur un rol important în dezvoltarea metodelor de screening RMN. Viteza dezvoltării RMN este încă rapidă, cu câmpuri magnetice care cresc continuu şi noi tehnologii care măresc sensibilitatea şi stabilitatea spectrometrelor RMN curente. Tehnologia crioprobelor a sporit sensibilitatea şi a transformat experimentele RMN în experimente care utilizează concentrații foarte mici ale probelor.

Experimentul SAR prin RMN tipic este acum accesibil pentru concentrații ale proteinelor de 50 μM. Cu toate acestea, experimentele care înregistrează spectrele proteinelor sunt limitate în mod curent la proteine relativ mici, cu greutăți moleculare de până la 40 kDa. Proteinele cu greutăți moleculare de 100 kDa vor putea fi „cunoscute” prin metode de marcare mai sofisticate. Actual, sunt disponibile

numeroase tehnici, fără nicio limitare a mărimii proteinei. Cerința referitoare la constanta de disociere a complexului proteină-ligand este oarecum limitatoare pentru aceste tehnici. Metodele bazate pe ligand au un potențial considerabil pentru screening-ul liganzilor (ePHOGSY, NOE pumping), cartografierea epitopilor (transferred NOE, STD-RMN) şi au fost utilizate chiar şi pentru a determina conformația liganzilor legați. Valoarea reală a RMN-ului în identificarea medicamentelor o constituie cantitatea mare de informații care pot fi obținute numai din câteva măsurători. În acest sens, RMN oferă un sprijin important pentru sistemele de analiză de mare capacitate (HTS tradițional) şi pentru noile metode de evaluare.

CAPITOLUL 10

MARCAREA PROTEINELOR CU IZOTOPII C^{13} ŞI N^{15} PENTRU ANALIZA STRUCTURII ŞI DINAMICII MACROMOLECULELOR BIOLOGICE

10.1. Introducere

Spectroscopia de rezonanță magnetică nucleară (RMN) a cunoscut o dezvoltare rapidă de-a lungul ultimului deceniu având o largă aplicabilitate şi un imens potențial pentru studiul structurii şi dinamicii macromoleculelor biologice. Ne referim mai ales la analiza structurii proteice care este principala beneficiară a progreselor tehnicilor RMN. Noile îmbunătățiri ale componentelor hardware şi implicit ale spectrometriei RMN cu puteri ale câmpului magnetic de până la 900 MHz au crescut sensibilitatea testărilor şi au redus considerabil numărul de probe necesare analizei. Mai mult, dezvoltarea tehnicii marcării izotopice şi apariția tehnicilor de analiză multidimensionale constituie adevărate pietre de hotar pentru studiul proteinelor. Structura microproteinelor în limitele a 10 kDa a putut fi analizată fără utilizarea tehnicilor de marcare izotopică după apariția tehnicii homonucleare bidimensionale (2-D) la sfârşitul anilor 1970 şi începutul anilor 1980.

Cu toate acestea însă, dincolo de această limită de 10 kDa, complexitatea crescută datorată variabilității structurale şi fenomenelor translaționale caracteristice, împiedică analiza structurală detaliată a macroproteinelor prin intermediul acestor tehnici. Prin urmare studiul structurii macroproteinelor necesită marcări multinucleare şi strategii speciale de investigare necesare pentru înlocuirea izotopilor N^{14} şi C^{12} din proteine, predominant inactivi RMN cu izotopii activi RMN C^{13} şi N^{15}. Protocoalele au fost dezvoltate astfel încât să se lucreze fie cu proteine uniform marcate cu C^{13}/N^{15} ori marcarea să fie utilizată doar pentru un situs specific.

Mai mult, experimentele utilizând RMN-ul multidimensional heteronuclear au fost concepute să utilizeze numărul relativ mare de cuplaje scalare mono sau policomponente evidențiate prin marcare. Folosind combinațiile chimice C^{13} şi/sau N^{15} induse, rezonanța H^1 de translație poate fi azi uşor separată în trei sau patru dimensiuni. Combinarea acestor tehnici interesează în special limitările impuse asupra studiului macroproteinelor şi permite determinări structurale proteice până la greutăți moleculare de aproximativ 22kDa. Această limită se poate extinde până la 44kDa prin simpla incorporare a H^2 la nivelul situsurilor proteice nonschimbabile.

În acest capitol vor fi detaliate recent descoperitele tehnici de încorporare a izotopilor N^{15} şi C^{13} în proteine, care au drept rezultat generarea unor analize spectrale extrem de sensibile şi implicit facilitarea analizei structurale a sistemelor proteice cu greutate moleculară mare. Strategiile de marcare convenționale necesitau supraproducții de proteine la nivelul structurilor bacteriene sau eucariote şi dintre acestea vom aminti cele mai avansate structuri ca o condiție indispensabilă a încorporării eficiente a izotopilor în proteine. Pe lângă studiile de structură, tehnica RMN joacă un rol important şi în descrierea dinamicii proteinelor precum şi în stabilirea relației de cauzalitate dintre dinamică şi funcție.

Prin urmare, vom prezenta tehnicile de marcare izotopică selectivă care ne permit evaluarea dinamicii lanțurilor laterale proteice precum şi a interacțiunii dintre proteină şi ligandul specific.

Cea de a doua parte a capitolului aduce în prim plan noile tehnici *in vitro*, care utilizează extracte acelulare pentru generarea de mostre de proteine. În timp ce sinteza de proteine de către sisteme acelulare, la o scară analitică, este posibilă deja de câțiva ani, producerea programată de proteine utilizând fracțiuni de *Escherichia coli* sau alte surse a devenit una dintre cele mai puternice mijloace de generare a probelor marcate pretabile la analiză RMN.

Prin urmare, ne vom referi la cele mai noi descoperiri în ceea ce priveşte sistemele de sinteză acelulare şi strategiile de marcare.

10.2. Sisteme de expresie ale încorporării *in vivo* a izotopilor C^{13} şi N^{15} în proteine

Dincolo de barierele tehnice, calitatea şi stabilitatea mostrelor de proteine limitează adesea analiza lor cu ajutorul tehnicilor RMN. Sensibilitatea relativ scăzută a majorității spectrometrelor RMN necesită pentru analiză concentrații proteice începând de la 0,2nM, însă în multe cazuri agregarea proteică se realizeză cu mult înainte de atingerea acestei limite. Pe lângă aceasta, probele trebuie să rămână stabile mai multe zile, pentru intervalul de timp necesar finalizării unui set întreg de măsurători. Mai mult, pentru a obține rezoluție maximă, analiza RMN necesită de regulă temperaturi relativ înalte, între 15-25°C, care pot de asemenea să afecteze stabilitatea proteinelor. Datorită costurilor mari pe care le implică prepararea unor probe de proteine marcate multinuclear, o probă va fi utilizată de mai multe ori, în experimente succesive, iar agregarea, denaturarea sau chiar degradarea proteinelor datorată denaturării cantității de proteaze sau activității auto-proteolitice, trebuie redusă la minim. Prin urmare producția de probe trebuie să fie destul de crescută, ceea ce pentru sistemele de expresie proteice convenționale *in vivo* reprezintă atingerea unei cantități minime de câteva miligrame per litru de mediu de cultură. Pentru a obține o rată de producție proteică optimă alegerea sistemului de expresie adecvat este de importanță extremă. Cel mai folosit microorganism în scopul producerii de proteine recombinate marcate specific este încă enterobacteria *E.coli*. O varietate extraordinară de sisteme de expresie şi vectori au fost creați pentru obiectivarea producerii de proteine de către *E.coli*, iar acestă vastă selecție este unul din motivele principale de alegere a sistemului de expresie proteic propriu lui *E.coli*. Majoritatea sistemele eucariote de producere a proteinelor au la bază speciile extrem de productive de *Pichia pastoris*. Marcarea proteinelor la nivelul celulelor de mamifere este doar rar realizată datorită costurilor mari pe care le implică atât tehnica cât şi obținerea unor precursori specifici dar şi randamentului scăzut.

Inițial probele de proteine au fost obținute prin cultura celulelor pe medii de cultură specifice, minime la care s-au adăugat compuşi marcați specific. Cei mai des folosiți precursori ai marcării includ $N^{15}H4Cl$, $(N^{15}H_4)_2SO_4$, $K^{15}NO_3$ şi $Na^{15}NO_3$

pentru marcarea cu azot şi $NaH^{13}CO_3$, [C^{13}]glicerol, [C^{13}]glucoză, [C^{13}]acetat pentru marcarea cu carbon. Numeroase elemente suplimentare cum sunt mixturi de elemente trasoare şi cocktailuri de vitamine au fost testate ca elemente de potenţare a creşterii celulare pe medii de cultură minime sau pentru a îmbunătăţi productivitatea. Mai mult mixturi simplu sau dublu marcate de aminoacizi, complexe algale (nutritive) şi agenţi de hidroliză microbiană au fost de asemenea adăugaţi mediilor de cultură [Brandner şi colab., 1999] cu scopul obţinerii unor proteine uniform marcate. În scopul reducerii costurilor izotopilor, celulele pot fi cultivate pe medii de cultură bogate, nemarcate până la obţinerea unor densităţi celulare mari, recoltate şi apoi suspendate în medii de cultură cu volum redus, predefinite şi marcate specific pentru producerea de proteine. Niveluri înalte de încorporare a izotopilor, concomitent cu o creştere a recoltei cu 4 până 8 straturi celulare a fost obţinută pentru *E.coli* utilizând această tehnică [Marley şi colab., 2001].

10.2.1. Producţia de proteine şi marcarea cu izotopi C^{13} şi N^{15} la nivelul sistemelor de expresie proteică din *E.coli*

Tehnicile de îmbogăţire izotopică ale fracţiunilor de *E.coli* sunt realizate deja de câţiva ani şi marea majoritate a proteinelor marcate, analizate prin spectroscopie RMN sunt încă produse prin expresie heterologă la nivelul diferitelor gazde ale lui *E.coli*, însumând până la 50% din totalul proteinelor celulare. În ciuda îmbunătăţirilor considerabile ale sistemelor de expresie eucariote şi acelulare, sistemele bacteriene rămân cele mai rapide şi economice sisteme de producere a proteinelor. Metodele standard de generare a mostrelor de proteine marcate heteronuclear din fracţiuni *E.coli* folosesc mediu minimal M9 sau derivaţi modificaţi ai acestuia, cu supliment de [C^{13}]glucoză, şi [C^{13}]glicerol pentru marcarea cu carbon, şi $(N^{15}H_4)_2SO_4$ şi $N^{15}H_4Cl$ pentru marcarea cu azot. Avantajul major al utilizării sistemului de expresie proteică al lui *E.coli* este reprezentat de selecţia crescută de vectori şi numărul mare de subtipuri disponibile. În ceea ce priveşte supraproducţia de proteine, este adesea necesar ca transcripţia genelor ţintă să poată fi reprimată pe cât de mult posibil până când celulele ating cea mai potrivită fază a creşterii, optimă inducerii. "Scurgeri" ale

procesului de reprimare genică, anterioare inducerii, pot favoriza acumularea de mutații la nivelul genei țintă, cu scopul de a suprima producerea de proteine nedorite, sau pot chiar produce lezarea sau apoptoza celulară secundară efectelor toxice.

Cei mai cunoscuți agenți inductori care acționează la nivelul sistemului de expresie al lui *E.coli* sunt enumerați în tabelul 10.1.

Tabelul 10.1. Promotori utilizați frecvent în inducerea supraproducției de proteine la *E.coli.*

Promotor	Origine	Reprimare	Inducere
P_{lac}	*E.coli.*	Lacl	β izopropiltiogalactozidă (IPTG)
P_{ara}	*E.coli*	AraR	L-arabinoza
P_{tet}	*E.coli*., Tn10	TetR	Tetraciclina
ø1- ø10	Bacteriofagi T7 sau T7 ARN polimeraza	reprimare/inactivare	Necesită intervenția T7 ARN polimeraza, IPTG
$^{\lambda}PL$	Bacteriofag λ	Represor λ cl	Indusă de căldură, modificări de temperatură de 42°C

Reprimarea puternicului promotor *E.coli.- lac* este realizată de către interacțiunea dintre agentul specific represor Lacl cu secvențe operatorii specifice din$P_{lac,}$ împiedicând prin urmare legarea ARN polimerazei *E.coli*. Proteina Lacl este eliberată de către operatorul său prin intervenția β izopropiltiogalactozidei (IPTG), un analog nonmetabolizabil al inductorului natural. Un dezavantaj al promotorului *lac* îl reprezintă expresia sa de fundal relativ ridicată. Acest eveniment poate fi parțial suprimat fie prin creşterea numărului de copii Lacl exprimate pe mediul de producție, fie prin introducerea de copii adiționale ale genei *lacI* pe o plasmidă sau prin creşterea expresiei cromozomiale a genei *lacI* printr-o mutație capabilă de inducerea transcripției promotorului nativ numit $lacI^{q}$. Numeroşi derivați cum sunt promotorii *tac* sau *trc*, au fost realizați prin fuziunea P_{lac} cu alți promotori, spre exemplu promotorii triptofanului.

În sistemele de expresie bazate pe promotorii T7, cu înaltă specificitate, producția de proteine este indusă de rezervele de T7 ARN polimerază. În principal T7 ARN polimeraza poate fi asigurată prin câteva modalități. O metodă folosită frecvent este exprimarea sa la nivelul unor regiuni special create purtătoare de copii cromozomiale ale genei 1 T7, care codifică T7 ARN polimeraza.

Această „construcție”, denumită „DE3”, reprezintă o fuziune transcripțională a genei 1 cu promotorul *lac* IPTG-indus. Pentru a asigura reprimarea strânsă a expresiei genice, gena 1 este acompaniată de o extra copie a genei *lacI*^{q}. Pentru a elimina orice cantitate adițională de T7 ARN polimerază, rezultată din reprimări ineficiente, poate fi indusă expresia genei rezultată din plasmidă care codifică T7 lizozimul. T7 lizozimul se leagă eficient şi inactivează T7 ARN polimeraza, iar exprimarea acestui sistem chiar permite producția şi marcarea proteinelor toxice ale *E.coli*.

În timp ce analiza structurală a proteinelor native reprezintă obiectivul major al tehnicilor care utilizează marcarea, majoritatea probelor au fost inițial produse ca fuziuni translaționale la alte proteine sau la peptide artificiale țintă (tabelul 10.2).

Tabelul 10.2 Ținte şi proteine transportoare pentru supraproducția de proteine în sisteme de fuziune

Fuziune	Efect asupra solubilității*	Purificare
Poly(His)$_6$-marker	fără efect	cromatografie cu afinitate pentru ioni de metal imobili (IMAC)
Strep-tag (metoda interacți-unii streptavidin-biotină)	fără efect	cromatografie de afinitate
Proteina de legare a maltozei	++	cromatografie de afinitate
Proteina NusA	++	
Glutation S transferaza	+	cromatografia de afinitate
Tioredoxina	+	
Proteina G (domeniul B1)	+	
Proteina D cu capat λ	+	
Proteina A (domeniu Z)	+	cromatografie de afinitate

*Efect asupra solubilității proteinelor țintă

Aceste strategii pot oferi avantaje deosebite în ceea ce priveşte purificarea rapidă şi eficientă a proteinelor țintă şi stabilizarea acestora. Mai mult, creşte adiția unui partener de fuziune veritabil la capătul N-terminal al proteinei țintă ceea ce poate stimula semnificativ producția acesteia. Complexele proteice de fuziune includ de obicei un situs de recunoaştere pentru proteazele cu înaltă specificitate asemenea enterokinazei sau proteazei TEV, în regiunea de unire a celor două proteine. Dacă este necesar, partenerii de fuziune pot fi dezlipiți de pe proteinele țintă după purificare, lăsând nemodificate proteinele marcate în vederea analizei. Cel mai

frecvent marker peptidic utilizat în scopul unei purificări facile este markerul poly(His)$_6$ adăugat la capătul N- sau C-terminal al proteinei. Asemenea micromarkeri de obicei nu influențează structura sau activitatea proteică şi îndepărtarea lor post-purificare, poate chiar să nu fie necesară. Proteinele ce conțin markerul poly(His)$_6$ pot fi purificate cu uşurință dintr-un extract celular brut, prin formarea unui complex chelator cu ionii metalici ca Ni^{2+} sau Cu^{2+} imobilizați pe o coloană cromatografică. Părților imidazolice ale restului adiacent de histidină sunt esențiale pentru formarea ansamblului chelator iar proteinele de legare pot fi ulterior spălate din coloană cu un gradient competitiv de imidazol. Obținerea de proteine, utilizând markerul poly(His)$_6$ a devenit o tehnică de rutină pentru evidențierea expresiei genelor heterologe recombinate, indiferent de gazdă.

Doar aproximativ 25% din supraproducția de proteine este inițial pretabilă sau suficient de stabilă pentru a fi supusă analizei structurale [Christendat şi colab., 2000] şi majoritatea experimentelor trebuiesc adaptate şi optimizate cu scopul obținerii unor „recolte" de proteine corect conformate. Ca parametrii generali ai optimizării sunt frecvent utilizate selecția unor gazde şi vectori de expresie viabili, variabilitatea condițiilor de creştere şi stabilirea concentrațiilor de inducere, construcția de proteine de fuziune şi coexprimarea proteinelor helper. O problemă frecvent întâlnită în ceea ce priveşte expresia heterologă la *E.coli* o reprezintă formarea de corpi de incluziune - mari agregate de proteine inactive. Marcarea proteinelor drept corpi insolubili de incluziune ar putea reprezenta o strategie de împiedicare a activității bactericide a proteinelor supraexprimate [Majerle şi colab., 2000]. Au fost descrise mai multe protocoale de solubilizare a corpilor de incluziune după purificare şi de refacere a structurii proteinelor denaturate până la obținerea structurii lor corecte 3-D. Cu toate acestea, strategia de reconformare trebuie optimizată pentru fiecare proteină în parte şi poate reprezenta o procedură laborioasă cu reuşite şi eşecuri, deşi uneori rezultatele nu sunt satisfăcătoare. Prin urmare, intenția este aceea de a maximiza obținerea de proteine în forme complet solubile.

Din fericire, în multe cazuri, formarea corpilor de incluziune în timpul exprimării proteice poate fi prevenită prin legarea la capătul C-terminal al proteinei țintă, al unui partener de fuziune extrem de solubil.

Mai multe proteine transportoare (carrier) sunt capabile să crească solubilitatea unei proteine de regulă insolubile (tabelul 10.2); în cercetările întreprinse pentru depistarea proteinelor capabile să confere solubilitate proteinelor țintă insolubile, prin fuziune la nivelul capătului C-terminal, proteina de legare a maltozei din *E.coli* - MalE şi proteina NusA s-au dovedit a fi cele mai eficiente. În condițiile în care macroproteinele de transport trebuiesc îndepărtate prin intermediul proteazelor specifice, anterior analizei RMN, clivajul proteinelor de fuziune poate reintroduce probleme de solubilitate şi recent eliberatele proteine țintă, uneori, tind să se precipite la scurt timp după ce nu mai sunt covalent ataşate la o proteină transportoare. Pe lângă acestea utilizarea de macroproteine transportoare ar conduce la pierderea unor cantități prețioase de precursori de marcare. Proteine transportoare cu greutate moleculară mai mică, cum ar fi proteina D cu capat λ, domeniile proteinei A a Staphylococului sau proteinei G a Streptococului [Zhou şi colab., 2001] pot fi utilizate drept elemente de ataşare nonclivatoare cu scopul creşterii stabilității microproteinelor şi peptidelor. Fuziunea cu domeniul B1 al proteinei G a dus chiar la îmbunătățirea spectrului RMN al proteinelor marcate. Pe lângă îmbunătățirea solubilității, proteinele transportoare pot fi folosite pentru a facilita producerea de mici peptide la *E.coli* şi pentru a le stabiliza împotriva degradării.

Asamblarea greşită a proteinelor poate fi o problemă la nivelul expresiei proteinelor eucariote în *E.coli*, în special dacă au încorporate mai multe legături disulfidice, dacă au în alcătuire subunități multiple sau conțin grupări prostetice. O strategie frecvent utilizată de abordare a acestor probleme o constituie coexprimarea proteinelor helper accesorii (tabelul 10.3).

Dacă asamblarea proteinelor supraexprimate depinde de factori de monitorizare, creşterea acestor factori de monitorizare prin coexpresia GroEL/ES, DnaKJ/GrpE sau a altor sisteme de monitorizare se poate dovedi extrem de avantajoasă. Rata scăzută de producție proteică datorată pauzelor translaționale sau a

încorporării greşite a aminoacizilor ca rezultat al utilizării codonilor ar putea fi optimizată prin coexprimarea tARNs corespunzătoare.

Tabelul 10.3 Modificările sistemelor de expresie ale *E.coli*

Probleme/necesități	Modificări
Formarea de punți disulfidice	expresie a regiunilor *trx*$^-$ şi *gor*$^-$, cu obținerea unui mediu citoplasmatic cu acțiune oxidantă coexpresia disulfid izomerazelor ca DsbA, DsbC sau PDI expresia periplasmatică folosind peptide semnal
Asamblarea proteică dependentă de cofactori de monitorizare	coexpresia factorilor de monitorizare ca GroELS şi/sau DnaKJ/GrpE
Utilizarea rară a codonilor	coexprimarea tARNs corespunzătoare

O problemă frecventă, care în multe cazuri nu îşi găseşte soluționare, apărută la folosirea sistemelor de expresie ale *E.coli* o reprezintă formarea corectă a legăturilor disulfidice în proteine. Strategiile care să permită formarea corectă de legături disulfidice, *in vivo*, includ exportul proteinelor supraexprimate la nivelul periplasmei cu efect oxidant prin adăugarea de secvențe semnalizatoare de export exprimate la nivelul unor regiuni special create lipsite de tioredoxină şi de glutation reductază oferind prin urmare un mediu celular oxidant şi coexprimarea izomerazelor disulfidice asemenea proteinelor DsbA şi DsbC ale *E.coli* sau a proteinei eucariote de monitorizare, disulfid-izomeraza (PDI).

10.2.2. Proteinele marcate cu izotopi C^{13} şi N^{15} ale *P. Pastoris*

Celulele din drojdia de bere combină multiple avantaje ale sistemelor de expresie pro- şi eucariote. Sunt mici ca dimensiuni, totuşi robuste şi uşor de manevrat. Rata de creştere a celulelor drojdiei de bere este mult mai rapidă comparativ cu alte celule eucariote iar fermentarea acestora este de regulă definitivată în câteva zile. Mai mult, drojdia nu necesită adăugarea de suplimente complexe pe mediul de creştere iar creşterea se poate propaga pe medii simple inextensive sau pe medii de geloză asemenea celor pentru *E.coli*. Rata lor excelentă de creştere pe medii definite minimale, face aceste celule extrem de atractive pentru utilizarea lor în producerea de

proteine țintă necesare analizei RMN. Pe lângă acestea, datorită capacității secretorii a proteinelor recombinate de *P. Pastoris*, purificarea se poate realiza rapid într-un singur pas [De Lamotte şi colab., 2001]. Multe proteine de origine eucariotă trebuie să treacă prin modificări specifice posttranslaționale asemenea glicozilarii sau lipidării, formării de legături disulfidice sau procesării posttranslaționale. Aceste modificări sunt adesea esențiale pentru stabilitatea activității enzimatice a proteinelor, sau pentru adoptarea conformației lor native. Eşecul formării legăturilor disulfidice corecte poate întârzia sau chiar bloca procesele de asamblare proteică determinând formarea de corpi de incluziune sau chiar degradare proteică. Producerea de proteine modificate nu poate fi abordată într-o manieră satisfăcătoare prin utilizarea unor gazde procariote ca *E.coli*. Exprimarea la nivelul celulelor de drojdie poate fi prin urmare soluția la căutările noastre a unor gazde cu potențial de creştere rapid şi posibilitatea de producere a proteinelor modificate şi glicozilate [Cereghino, Cregg, 2000]. Cu toate acestea, trebuie luat în considerare faptul că modelul de modificare proteică obținut după exprimare la nivelul drojdiei de bere poate să fie diferit de cel prezent la nivelul proteinelor native , spre exemplu, celulele de drojdie sunt capabile doar de ataşarea glicanilor bogați în manoză, care reprezintă polizaharida centrală a glicoproteinei.

Abordarea tehnicilor de marcare ar trebui să ia în considerare faptul că producția de proteine heterologe din *P. Pastoris* este corelată cu o densitate celulară mare. Creşteri de aproare 100 straturi de proteină în cultură au fost obținute prin fermentația celulelor în bioreactoare spre deosebire de aşa numitele culturi proteice agitate sau submerse [Van den Burg şi colab., 2001]. Inducerea producției de proteine heterologe ar trebui declanşată după atingerea unei densități celulare mari. Au fost înregistrate chiar producții de peste 100 mg proteină per litru de cultură. În culturile proteice agitate, producțiile raportate de proteine heterologe uniform marcate au variat de la 2 mg/l în cazul proteinei de control a complementului virusului Vaccinia până la cantități de 27 mg/l pentru proteina anticoagulantă a căpuşei. Prin urmare, producția medie de proteine de drojdie obținută prin tehnica culturilor agitate atinge doar limita inferioară a cantității de proteine produse prin cultivarea extractelor de

E.coli. În consecință, este important să subliniem că în raport cu producția de proteina la *E.coli*, vor fi necesare cantități mult mai mari de izotopi marcați specific pentru a induce o creştere rezonabilă a celulelor de drojdie, fiind necesare concentrații de 5 până la 10 ori mai mari de $(N^{15}H_4)_2SO_4$ şi $[C^{13}]$glucoză la o cultură celulară submersată de rutină. Pentru a produce 90 mg de fragment C^{13} marcat de trombomodulină în cultura de *P.pastoris*, trebuiesc adăugate de asemenea 143 g $[C^{13}]$glicerol sau 162g $[C^{13}]$glucoză la culturile celulare crescute într-un fermentator de 1,25 l. Prin urmare din rațiuni economice, tehnicile care folosesc drojdia de bere devin competitive doar în cazul în care proteinele nu pot fi obținute utilizându-se *E.coli*.

Pe medii de cultură definite minimale singura sursă de nitrogen pentru *P.pastoris* o reprezintă de obicei NH_4OH, care serveşte în plus la neutralizarea unor cantități considerabile de acid produse de drojdie în timpul creşterii. Cu toate acestea însă, din rațiuni economice NH_4OH trebuie înlocuit cu $(N^{15}H_4)_2SO_4$ pentru proteinele de *P.pastoris* marcate cu N^{15}. Atingerea densității celulare necesare implică adiția de cantități mari de $(N^{15}H_4)_2SO_4$ cu creşteri concentraționale de 40 de ori mai mari decât cele necesare în procesul de fermentare al lui *E.coli*. Pentru a evita orice efect negativ asupra creşterii celulare care derivă din creşterea puterii ionice a mediului ca urmare a formării de K_2SO_4, $(N^{15}H_4)_2SO_4$ trebuie adăugat fracționat, la momente diferite, şi opțional combinat cu acțiunea de schimbare a mediului anterior inducerii exprimării proteice.

Pentru marcarea proteinelor cu C^{13} folosind puternicul promotor *AOX1*, sunt necesare de regulă două surse de carbon în timpul fermentării, şi ne referim la glicerol şi glucoză cu scopul de a obține o densitate celulară mare şi metanol necesar inducției promotorului *AOX1*. Deşi *P.pastoris* poate creşte cu metanolul ca unică sursă de carbon, timpul lent de dublare ar împiedica atingerea unor densități celulare mari şi necesită prin urmare surse alternative de carbon ca glicerolul sau glucoza. În timp ce glucoza ar putea cu siguranță să sporească densitatea celulară, are rol şi în reprimarea promotorului *AOX1*, conducând la o descreştere a producției de proteine heterologe. Cu toate acestea $[C^{13}]$glucoza poate fi utilizată în experimentele de

marcare ca sursă inițială de carbon până la atingerea unei densități celulare corespunzătoare. Apoi celulele pot fi fermentate mai departe prin adăugarea de [C^{13}]glicerol ca sursă de carbon iar inducția să aibă loc sub acțiunea [C^{13}]metanolului. Aproximativ 30% din carbonul din proteinele marcate derivă din metanol şi prin urmare devine indispensabilă inducția producerii de proteine cu [C^{13}]metanol pentru a obține proteine complet marcate, în special atunci când folosim subtipuri de drojdie cu un genotip *mut*$^{+}$.

10.2.3. Marcarea cu izotopi C^{13} şi N^{15} a proteinelor exprimate în celulele ovariene ale hamsterului chinezesc (CHO)

Comparativ cu celulele drojdiei de bere, celulele ovariene ale hamsterului chinezesc (CHO) oferă alternativa unui sistem mai avansat care face posibilă generarea de probe marcate care să conțină toate modificările specifice proteinelor eucariote. Asemenea celulelor de drojdie proteinele recombinate pot fi secretate eficient în mediu de cultură, fiind înregistrate rate de producție proteică la celulele CHO de peste 100 mg/l. Cu toate acestea, celulele provenind de la mamifere necesită de obicei aminoacizi, vitamine, cofactori şi în multe cazuri seruri complexe ca aditivi la mediul de cultură. Pentru a reduce costurile, celulele CHO pot fi de asemenea crescute prin înlocuirea aminoacizilor marcați izotopic, care sunt extrem de scumpi, cu compuşi de hidroliză bacteriană sau complexe algale (nutritive) fiind obținute astfel cantități suficiente de proteine recombinate îmbogățite cu izotopi. Pentru prevenirea diluției izotopilor de marcare cu aminoacizi nemarcați provenind din ser, ar trebui inclusă o etapă de dializă cu scopul de a elimina din ser compuşii cu greutate moleculară mică. De asemenea un factor extrem de important şi probabil potențator al costurilor, îl reprezintă necesitatea înregistrării unor concentrații destul de crescute de glutamină marcată, esențială circuitului metabolic al multor aminoacizi şi a variatelor componente ale acizilor nucleici. Deşi celulele CHO reprezintă „gazde” scumpe pentru generarea de proteine marcate, ar putea reprezenta cea mai bună opțiune pentru supraexprimarea glicoproteinelor complexe sau a proteinelor care nu pot fi produse de *E.coli*.

10.2.4 Marcarea proteinelor cu izotopi C^{13} şi N^{15} la alte organisme

O altă opțiune de producere a proteinelor marcate glicozilate o reprezintă supraproducția acestora la nivelul unei specii de amoeba – *Dictyostelium discoideum*. Această gazdă are capacitatea de a se hrăni cu celule bacteriene asemenea celor de *E.coli* care pot fi apoi pre-îmbogățite cu markeri izotopici utilizând protocoalele standard. Vectori de expresie potriviți sunt disponibili pentru *D.discoideum* şi o proteină glicozilată de 16 kDa a fost deja marcată într-o proporție mare cu C^{13}/N^{15} [Cubbedu şi colab., 2000]. În condițiile în care rata de creştere a *D.discoideum* este destul de lentă, întreaga procedură a durat peste 10 zile. Cu toate acestea, comparativ cu tehnicile de marcare realizate pe celule de drojdie de bere, o cantitate semnificativ mai mică de precursori de marcare a fost folosită acum cu scopul obținerii unei cantități suficiente de proteine pentru măsurătorile RMN, indicând prin urmare *D.discoideum* ca alternativă mai puțin costisitoare pentru producerea de glicoproteine marcate.

În timp ce sistemele de exprimare discutate anterior necesită diferite cantități de precursori de marcare, relativ scumpi, în cazul cianobacteriei de fotosinteză *Anabaena sp.* cultivarea se poate face pe medii definite conținând $Na^{15}NO_3$ şi NaH^{13} Co_3 ca unice surse de nitrogen şi carbon. Un domeniu de 24-kDa a subunității B a ADN-girazei din *E.coli* a fost supraexprimată cu succes în *Anabaena sp.* cu ajutorul unui sistem special conceput de vectori de clonare obținându-se astfel o încorporare de peste 90% a izotopilor de marcare C^{13}/N^{15} [Desplancq şi colab., 2001]. Producția de proteine (aproximativ 3-6 mg/l) a fost considerată asemănătoare cu aceea obținută la *E.coli*. Este demn de menționat că gena exprimată s-a aflat sub controlul promotorului *tac* al *E.coli*, funcțional de asemenea şi în *Anabaena*. În timp ce marcarea cu izotop N^{15} la *Anabaena* poate fi realizată utilizând protocoalele standard de creştere , marcarea cu C^{13} se dovedeşte problematică în condiții aerobe datorită abilității de fixare a CO_2 endogen, având drept rezultat o marcare incompletă cu C^{13} uneori de sub 30%. Cu toate acestea însă, îmbogățirea cu izotop C^{13}, de peste 90%, poate fi obținută prin cultivarea celulelor de *Anabaena* pe medii aerate cu nitrogen în condiții anaerobe controlate. Procesul de fermentare al *Anabaena* necesită iluminare

iar durata sa totală este de aproximativ cinci ori mai mare decât cea a lui *E.coli*, datorită timpului de dublare mai lent. Cu toate acestea în condițiile în care pot fi utilizați precursori de marcare mai ieftini , costurile totale se pot reduce cu aproximativ 10%. Poducția de proteine heterologe la *Anabaena* poate constitui o opțiune pentru generarea de proteine cu o rată de producție scăzută care necesită cantități mai mari de mediu de cultură. Pe lângă toate acestea trebuie luat în considerare că natura deprotonată a rezervelor de carbon final se poate dovedi avantajoasă şi economică pentru generarea unor probe de proteine deuterate necesare analizei structurale a macroproteinelor sau studiilor dinamice (Dingermann şi colab., 2004).

Deşi producerea de proteine heterologe reprezintă abordarea cea mai comună, microproduşii peptidici au fost de asemenea marcați în mediul lor nativ. O condiție esențială este aceea ca organismul să se poată adapta la creşterea pe medii specifice îmbogățite cu precursori corespunzători. Exemple de abordări încununate de succes sunt reprezentate de marcarea ciclosporinei A la *Tolypocladium inflatum*, alamethicina din *Trichoderma viride*, belenaminei la *Streptomyces nashvillensis* şi cianoficinei în sporii *Synechocystis*.

10.2.5. Strategii de producere a proteinelor marcate selectiv cu izotopi C^{13} şi N^{15}

Spectrul RMN al proteinelor uniform marcate a devenit din ce în ce mai complex odată cu creşterea dimensiunilor proteice. Au fost elaborate mai multe metode care permit marcarea selectivă a unor domenii specifice, a aminoacizilor sau chiar marcarea uninucleară a proteinei cu scopul simplificării analizei spectrale. Utilizând tehnici de marcare *in vivo*, acest tip de marcare se poate realiza prin „hrănirea” celulei gazdă cu precursori de marcare special creați, obținuți în majoritatea cazurilor prin sinteză chimică. Simplificarea spectrală care derivă, facilitează distribuirea exactă a rezonanței în macroproteine. Alegerea strategiei de marcare corecte poate fi prin urmare deosebit de importantă pentru distribuirea rezonanței la nivel proteic.

10.2.5.1. Marcarea selectivă a aminoacizilor

În general orice rest de aminoacid dintr-o proteină supraexprimată poate fi marcat specific prin suplimentarea mediului de cultură cu cantități mari din aminoacidul respectiv, conținând izotopul de marcare dorit. Rezonanța corespunzătoare aminoacizilor unici poate fi uşor identificată raportând-o la spectrul unei proteine care conține alți aminoacizi marcați iar asemenea abordări ar putea creşte considerabil rezonanța macroproteinelor. Cu toate acestea, costurile mari pe care le implică marcarea aminoacizilor previn aplicarea acestei tehnici ca analiză de rutină folosită pentru determinări structurale. Metoda marcării selective îşi găseşte aplicabilitate în caracterizarea dinamică şi funcțională a resturilor de aminoacizi, spre exemplu analiza interacțiunii cu liganzii. Marcarea specifică este de asemenea folosită pentru studiul denaturării proteinelor. Proteinele neasamblate au în general o dispersie joasă a rezonanței, dar urmărirea unui număr limitat de resturi de AA marcate, care ideal sunt distribuite uniform în întreaga proteină, poate facilita analiza procesului de asamblare. Într-un studiu anterior, marcarea selectivă cu [N^{15}]izoleucină a fost utilizată pentru detectarea intermediarilor de asamblare care acționează la nivelul unei proteine complexe [Biekofsky şi colab., 2002].

Ca o alternativă la marcarea selectivă a aminoacizilor, prin marcarea izotopică inversă, produsul în exces al unuia sau mai multor aminoacizi nemarcați este adăugat la mediul de cultură în combinație cu compuşi de marcare generală ca $N^{15}H_4Cl$ sau [C^{13}]glucoză.

O formă de aplicabilitate interesantă o reprezintă marcarea inversă a resturilor aromatice asemenea fenilalaninei sau tirozinei în condițiile în care lanțurile lor laterale sunt adesea implicate la nivelul interfețelor de ataşare de ligand sau poziționate în miezul hidrofobic al proteinei, ceea ce face ca restricțiile de distanță să fie extrem de importante pentru mediul intern al acestor particule [Goto, Kay, 2000]. Aplicarea marcării izotopice inverse depinde clar de complexitatea proteinei analizate şi este în general mai utilă în studiul proteinelor cu greutate moleculară mică care să conțină doar puține din resturile de aminoacizi analizate. Aplicarea tehnicilor de

marcare izotopică specifice sau selective este limitată datorită efectului de dezorganizare pe care izotopul de marcare îl are asupra celorlalte reziduuri.

Mutanții auxotrofici (bacterieni) specifici lui *E.coli* poate fi utilizat pentru supraexprimarea şi marcarea specifică a proteinelor recombinate pentru a minimaliza acest efect.

10.2.5.2 Marcarea specifică cu izotopul C^{13}

Aminoacizi marcați la nivelul unor poziții selectate ale carbonului pot fi adăugați la medii de creştere specifice cu scopul încorporării lor în proteina recombinată. Aceşti compuşi marcați parțial au fost de obicei generați prin sinteză chimică şi indroduşi pentru a optimiza rezoluția spectrală a macroproteinelor supuse experimentelor RMN.

Protonii catenelor alifatice laterale pot fi dificil de abordat dacă numărul de reziduuri alifatice creşte. Reziduurile de fenilalanină marcate cu izotop C^{13} doar în poziția ε pot ajuta la distribuirea rapidă a protonilor inelului aromatic. Mai mult, proteinele complet marcate cu izotop C^{13} prezintă cuplări scalare nedorite $C^{13\alpha}$-$C^{13\beta}$. Încorporarea aminoacizilor marcați în centrul izotopului C^{13} duce la depăşirea acestei probleme. Marcarea fracționată a aminoacizilor cu C^{13} poate fi obținută prin creşterea celulelor producătoare de proteine împreună cu o mixtură specifică de surse de carbon marcate cu C^{13} şi C^{12} [Atreya, Chary, 2001].

Analiza dinamicii porțiunii interne a lanțurilor laterale ale proteinelor uniform marcate cu izotop C^{13} poate fi de asemenea complicată datorită efectelor diferitelor interacțiuni dintre diverşi factori care contribuie la relaxare şi implicit, datorită contribuției cuplărilor scalare şi dipolare C^{13}-C^{13}. Pentru a rezolva această problemă proteinele pot fi sintetizate cu un model de marcare alternativ C^{12}-C^{13}-C^{12} realizat printr-o procedură de marcare izotopică elaborată care utilizează fie [2-C^{13}] glicerol sau [1,3-$C^{13}{}_2$] glicerol ca unică sursă de carbon.

Mai multe strategii de marcare carbon selective se dovedesc extrem de valoroase mai ales în combinație cu protonarea selectivă pentru analiza structurală a proteinelor cu greutate moleculară mare.

10.2.5.3. Marcarea izotopică segmentară

În ciuda dezvoltării tehnicilor RMN heteronucleare multidimensionale, complexitatea crescută a determinărilor spectrale datorată lipsei de rezoluție, suprapunerii crescute a semnalelor care induc modificări chimice similare, limitează încă analiza structurală a macroproteinelor. Cu toate acestea tentative promițătoare de extindere a dimensiunii limită proteice care se pretează evaluării structurale prin spectroscopie RMN, sunt reprezentate de tehnicile de marcare segmentare sau în bloc (Dingermann şi colab.,2004).

În principiu proteinele de lungime completă, parțial marcate, pot fi produse de legarea posttranslațională *in vitro* de domenii nemarcate în asociere cu domenii marcate obținute prin diferite experimente pentru inducerea expresiei. Rezonanța domeniilor unice ale macroproteinelor poate fi interesată secvențional iar structura proteică completă poate fi obținută printr-o abordare combinatorie, divizând o macroproteină țintă în părți de dimensiuni cu care să se poată opera. Gândindu-ne la elucidarea structurii domeniilor proteice izolate nu trebuie să uităm că structura domeniilor marcate specific prin intermediul tehnicii de marcare segmentară este analizată în contextul proteinei complete, oferind prin urmare informații asupra interacțiunilor structurale şi funcționale dintre domenii, păstrând totodată caracterul structural de bază al proteinei. Procesul de legare este catalizat de enzime auto-restrictive - intronii. Intronii sunt secvențe de inserție clivate după translație prin auto-excizie, lăsând regiunile de flancare proteice, exonii, unite prin structura de legare nativă peptidică.

În funcție de natura intronilor şi de solubilitatea domeniului țintă, au fost elaborate mai multe protocoale modificate de marcare segmentară.

● Intronul este secționat la nivelul porțiunii de mijloc al unei secvențe din interiorul regiunii formate din bucle flexibile iar cele două fragmente sunt exprimate separat ca elemente de fuziune la domeniul țintă. Proteinele izolate denaturate sunt amestecate iar cele două fragmente de intron se asociază eficient în timpul asamblării, având drept rezultat legarea celor două domenii țintă. Această strategie are o aplicabilitate deosebită dacă intronii de fuziune sunt exprimați sub formă de corpi de

incluziune insolubili şi dacă un protocol eficient de reasamblare este disponibil. Folosind introni diferiți la fiecare îmbinare/joncțiune se pot genera chiar proteine care conțin domenii marcate central.

● Ataşarea chimică a proteinelor asamblate sub condiții native foloseşte un etil α tioester la capătul C terminal al unei proteine recombinate, generat de clivajul unui intron de fuziune, în scopul fuzionării cu o altă proteină sau peptidă care conține reziduuri de cisteină la capătul N terminal. Ambii parteneri de fuziune pot fi combinați într-o structură corect asamblată, la un pH fiziologic, iar această strategie ar putea fi extinsă în principal la legarea a mai mult de două domenii.

● Mini intronul din gena dnaE a cianobacteriei *Synechocystis* sp. conține mai puțin de 200 de resturi de aminoacizi şi este divizată în fragmente N- şi C-terminale care sunt exprimate separat. Dacă sunt combinate după purificare cele două fragmente interacționează eficient, în condiții native, cu scopul de a cataliza reacțiile de îmbinare şi fuziune ale proteinelor covalent ataşate [Evans şi colab., 2000]. Domeniile țintă de fuziune trebuie exprimate ca fuziuni N- sau C- terminale cu fragmentele de introni.

Deşi au fost înregistrate creşteri ale fuziunilor *in vitro* de până la 90%, o serie de probleme potențiale trebuie luate în considerare atunci când încercăm o abordare a tehnicii marcării segmentare. În timp ce majoritatea reziduurilor enzimatice importante sunt localizate în interiorul intronilor, un mecanism eficient de excizie şi fuziune necesită şi implicarea unor reziduuri cu originea în exon, reacția nefiind prin urmare complet independentă de secvența de joncțiuni proteice nou formate. Capătul C-terminal al exonului necesită resturi de cisteină sau treonină iar la capătul N-terminal serină. Asigurarea acestor necesități nu trebuie să afecteze structura sau activitatea proteinei analizate. Condițiile de asamblare şi fuziune trebuiesc optimizate şi individualizate pentru fiecare proteină în parte, iar joncțiunea de fuziune/îmbinare ar trebui localizată într-o regiune buclă pentru a asigura flexibiliate maximă. În ceea ce priveşte marcarea în bloc aceasta pare a se aplica mai bine la studiul proteinelor compuse din domenii independent asamblate cu proprietăți biochimice distincte.

10.3. Marcarea izotopică acelulară

Sinteza de proteine acelulară reprezintă o alternativă promiţătoare şi atractivă la tehnologiile convenţionale de producere a proteinelor cu ajutorul culturilor de celule bacteriene sau eucariote. În contrast cu metodele *in vivo* de exprimare genică în care sinteza de proteine este realizată într-un context celular cuprinzând pereţi şi membrane celulare, sinteza acelulară de proteine se realizează într-un sistem complet deschis. Acest tip de sistem permite controlul direct şi accesul la reacţie în orice moment. Compuşi care pot îmbunătăţi producţia de proteine sau care pot stabiliza proteinele recombinate, cum sunt proteinele de însoţire/chaperone, detergenţii sau inhibitorii de protează, se pot adăuga uşor fără a determina efecte secundare asupra metabolismului celular sau sistemului de transport celular prin membrană. Majoritatea funcţiilor celulare, cu excepţia transcripţiei şi translaţiei, nu trebuiesc întreţinute în timpul expresiei proteice acelulare. Prin urmare aplicabilitatea poate fi extinsă la proteine sau condiţii care nu pot fi tolerate de către organismele vii. În timp ce producţia *in vivo* de proteine este adesea limitată prin formarea de corpi de incluziune insolubili sau datorită instabilităţii proteice cauzată de proteazele intracelulare, sistemele acelulare oferă noi posibilităţi de sinteză a proteinelor complexe (tabelul 10.4).

Tab. 10.4 Avantaje şi dezavantaje potenţiale ale sintezei proteice acelulare

Avantaje potenţiale	**Dezavantaje**
Sistem complet deschis (acces uşor) → adaptarea condiţiilor de reacţie la proteinele sintetizate Încorporarea de aminoacizi marcaţi, glicozilaţi, modificaţi sau sintetici Translaţia directă a produşilor PCR→rată de transfer înaltă Producţia de proteine toxice Producţia de proteine de ataşare la membrană Expresia de cofactori de solicitare a proteinelor Adiţia uşoară de proteine de însoţire /chaperone sau PDI Miniaturalizarea (reacţii de 50 μl) Eliminarea organismelor vii→fără restricţii de creştere Posibilitatea izolării directe a produşilor cu scopul scurtării intervalului de preparare a proteinelor purificate	Productivitate scăzută adesea Sisteme complexe comparate cu sinteza de proteine *in vivo* Tehnică costisitoare comparativ cu modalitatea de exprimare *in vivo* Numărul mic de sisteme comerciale şi kituri Standardizarea dificilă datorată multitudinii componentelor de reacţie Costuri ridicate

Asamblarea proteinelor şi stabilitatea acestora poate fi promovată prin adăugarea directă de proteine de însoțire/chaperone, PDI şi cofactori necesari. În contrast supraexprimarea chaperonelor *in vivo* poate conduce la filamentarea celulară sau la exprimarea altor fenotipuri nedorite care se pot dovedi dăunătoare pentru viabilitatea celulelor *E.coli* şi a expresiei proteice. Parametrii de reacție asemenea pH-ului, potențialului redox şi puterii ionice pot fi determinate fară apariția de efecte nocive asupra creşterii şi viabilității celulare dar cu siguranța că aceşti parametrii vor influența direct reacțiile relevante. Această nouă oportunitate de expresie genică *in vitro* permite controlul deplin şi flexibilitatea înaltă a condițiilor de testare şi totodată oferă noi perspective asupra dificultăților acociate cu citotoxicitatea, degradarea proteolitică, asamblarea improprie ori agregarea proteinelor sintetizate. Cu ajutorul PDI, chaperonelor sau virusurilor funcționale s-a observat producția de proteine citotoxice , proteine de membrană. Cel mai important însă este faptul că sinteza de proteine acelulară oferă noi posibilități de incorporare a aminoacizilor marcați, glicozilați, modificați sau sintetici. Un alt element promițător al sintezei proteice acelulare poate fi constatat la nivelul implicării sale la expresia de proteine cu rată înaltă de transfer prin translația directă a produşilor reacției de polimerizare în lanț (PCR). Limitele actuale ale sistemelor acelulare sunt corelate cu înalta lor complexitate, costurile mari şi adesea productivitatea scăzută.

10.3.1. Componentele sistemelor de expresie acelulare

În ceea ce priveşte sistemele de producție acelulare, toate componentele implicate în expresia genică şi sinteza proteică trebuiesc adăugate în amestecul de reacție (fig. 10.1). Componente precum ADN-ul, nucleotid trifosfații (NTPs), ARN-ul mesager (ARNm), ARN-ul de transfer (ARNt), aminoacil-ARNt-sintetaza (ARSases), polimerazele, ribozomii, factorii de transcripție şi translație precum factorii de inițiere (IFs), factorii de elongare (EFs) sau factorii de eliberare (RFs) şi de asemenea aminoacizii trebuie optimizați din punct de vedere al concentrației, salinității şi pH-ului mediului. Procesul de transcriere/translație necesită cantități mari de energie liberă asigurată prin hidrolizarea GTP şi ATP trifosfaților. Prin urmare,

sinteza *in vitro* de proteine necesită implicarea unui sistem ATP de regenerare a energiei care să mențină stabilă concentrația trifosfatului. În scopul acesta au fost folosiți fosfați donori de înaltă energie cum sunt acetil fosfatul (AcP), creatin fosfatul (CrP) sau fosfoenol piruvatul (PEP) în prezența kinazelor proprii (acetat kinaza, creatin kinaza şi piruvat kinaza).

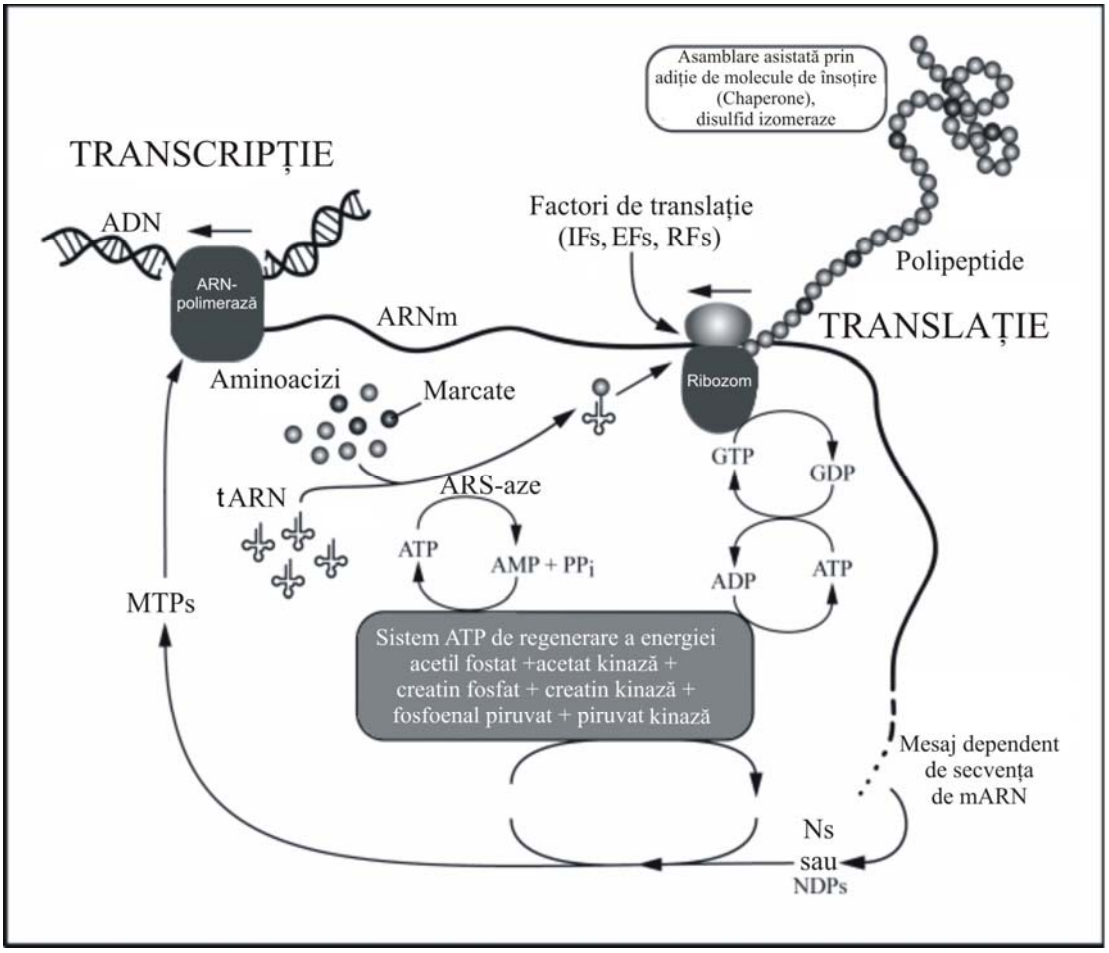


Fig. 10.1 Ilustrarea schematică a sintezei proteice acelulare, evidențiind procesele cuplate de transcripție şi translație într-un sistem bacterian. Inițial celulele sunt cultivate, lizate iar extractul celular este pregătit prin adăugare de ribozomi, factori de translație asemenea factorilor de inițiere (IFs), factori de elongare (EFs) sau factori de eliberare (RFs) şi pe lângă aceştia acetat kinaza şi aminoacil-tARN-sintetaza (ARS-aza). Substraturile precum aminoacizii, componentele sistemului de regenerare al energiei ori nucleozid trifosfatul (NTPs) sunt tratați cu o sare şi apoi adăugați la extract iar sinteza de proteine este inițiată după adăugarea copiei de ADN. ADN-ul este transcris prin adăugarea unei ARN polimeraze. tARN-ul adăugat este încărcat cu aminoacizi de către ARS-azele, aminoacizi care vor fi utilizați în translația mARN. Incorporarea unor aminoacizi marcați cu izotopi stabili (particulele întunecate) poate fi realizată cu uşurință în sistemul acelular, ceea ce conduce la obținerea unei proteine marcate izotopic selectiv. Regenerarea ATP şi GTP şi chiar NTPs din sistemul acelular este obținută printr-un sistem ATP de regenerare a energiei bazat pe hidroliza substraturilor generatoare de energie înaltă în prezența kinazelor proprii. Moleculele de însoțire (chaperonele) pot fi uşor adăugate la mixtura de reacție pentru a asista asamblarea proteinei țintă.

Un component important este un extract celular bazat pe celule brute lizate care conține componentele necesare de reacție precum IFs, EFs, RFs, ARS-aze, ARNt şi enzime ca acetat kinaza, necesare regenerării energetice. Sistemele de expresie acelulare pot fi clasificate în funcție de originea extractului. În principiu, sistemele funcționale *in vitro* pot fi realizate din orice tip de celule, însă la eficacitatea producției de proteine contribuie mulți factori. Cele mai comune reacții *in vitro* au la bază extracte de *E.coli,* germeni de grâu sau reticulocite lizate de iepure (tabelul 10.5).

Tabelul 10.5. Sisteme de expresie acelulare bacteriene şi eucariote

Sisteme bacteriene		**Sisteme eucariote**	
Escherichia coli		**Germeni de grâu**	**Reticulocite de iepure**
Prepararea extractului S30	**Prepararea extractului S100**	**Extract de germeni de grâu**	**Reticulocite lizate de iepure**
Fracțiunea de supernatant centrifugată la 30000g din extract de *E.coli* preincubată pentru a diminua ADN-ul şi mARN	Fracțiunea de supernatant centrifugată la 10000g privată de toți acizii nucleici, spre exemplu prin tratament DEAE cu celuloză	Utilizat direct pentru expresia copiilor endogene şi exogene	Tratate cu RN-aze dependente de Ca^{2+}
Conține: ARN polimeraza, ribozomi, tARNs, ARS-aze, factori de translație	Conține: ARN polimeraze, ARS-aze şi factori de translație	Conține: ribozomi, tARNs, ARS-aze, factori de translație	Conține: ribozomi, tARNs, ARS-aze, factori de translație
24 - 38° C (optim 37° C)[a]	Ribozomi, tARNs adăugați la 24- 38°C (optim la 37°C)[a]	20-27°C până la 32°C[a] [Tulin şi colab., 1995][b]	30- 38°C[a] [Craig şi colab., 1992][b]

[a]Temperetura de reacție
[b]Referințe
Elemente de adăugat:
ADN (plasmidă cu promotor potrivit pentru SP6, T7 ARN-polimeraza)+ polimeraza (bacteriofagul SP6 sau T7 ARN polimeraza) sau mARN
Aminoacizi.
Componente energetice: ATP sau GTP.
Sistem NTP de regenerare al energiei: PEP+PK sau CP+CrP sau AcP.
Formil tetrahidrofolat sau omonimele sale metenil tetrahidrofolat sau acid folinic.
Compus-SH: mercaptoetanol sau ditiotreitol (DTT).
Mg^{2+} şi K^{+} în concentrații optime.
Necesare uneori:
Ca^{2+} şi NH_4^{+} în concentrații optime.
cAMP.
Poliamine, spre exemplu spermidina

Extractele obținute din *E.coli* conțin aşa numita fracție de supernatant S30, numit după fracția solubilă centrifugată la 30000 g, care conține ribozomi endogeni, enzime ca acetat kinaza şi factori necesari transcripției şi translației, ARS-aze, ARNt, ARNm. ARNm endogen este îndepărtat de ribozomi în timpul preincubării extractului celular brut într-o etapă de evacuare şi apoi distrus de ribonucleazele endogene. O altă modalitate de manevrare a extractelor bacteriene este descrisă în cadrul sistemului Gold-Schweiger. Ribozomii sunt adăugați la fracția supernatant a unui extract S100 special purificat de aminoacizii endogeni şi acizii nucleici prin cromatografie schimbătoare de ioni. Acest sistem oferă o acoperire destul de scăzută datorită sintezelor endogene şi a condițiilor de reacție mai bine controlate în detrimentul unei preparări mai complicate.

Sistemul *E.coli* funcționează bine la variații de temperatură între 24-38°C, optimă fiind temperatura de 37°C. Extractele de germeni de grâu prezintă un nivel scăzut de mesageri exprimați endogeni şi prin urmare, poate fi direct utilizat în exprimarea modelelor endogene şi exogene. În sistemul bazat pe extracte de germeni de grâu temperatura variază între 20-27°C, însă poate fi crescută până la 32°C asigurând o exprimare mai ridicată a anumitor compuşi. Extractul de reticulocite este preparat prin lizarea directă a celulelor sanguine obținute de la iepuri anemici, existenței acestei patologii permite creşterea numărului de proeritrocite sau reticulocite care ulterior sunt tratate cu RN-aze dependente de Ca^{2+} cu scopul eliminării ARNm-ului endogen. Acest sistem funcționează la valori ale temperaturii cuprinse între 30-38°C. În ceea ce priveşte temperatura de reacție trebuie notat că, pe lângă orice efect asupra procesului enzimatic de transcripție/translație şi asupra degradării ARNm, temperatura afectează implicit şi asamblarea proteinelor sintetizate. Pentru a asista asamblarea proteinelor, chaperonele asemenea sistemului GroEL/ES sau DnaK ori DnaJ se pot adăuga la mixtura de reacție. De regulă, temperaturile mai joase vor conduce la recolte mai mari de proteine recombinate, în absența chaperonelor, însă în prezența acestora recoltele nu sunt neapărat mai scăzute. Mai mult, pentru a asista formarea de legături disulfidice, PDI se poate adăuga la mixtura de transcripție/translație.

Sistemele de translație mai puțin comune bazate pe extracte de drojdie de bere, pe celule de mamifer asemenea celulelor umane HeLa şi celulelor L de şoarece sau pe cloroplaste de tutun, care depind mult de adăugarea exogenă de ARNm, prezintă nivele înalte de degradare şi producții de proteine relativ scăzute. În ceea ce priveşte marcarea proteică acelulară, s-au folosit doar extracte de *E.coli* şi germeni de grâu. Folosind o abordare extrem de elaborată, Shimizu şi colab.,(2001) au elaborat un sistem de translație acelular reconstruit din factori de translație purificați poli(His)-marcați . Sistemul lor numit „sinteza de proteină realizată cu ajutorul elementelor recombinate" (PURE), conține 32 de componente purificate individual, cu activitate înalt specifică, care să permită producerea eficientă de proteine. Un avantaj al sistemului PURE, în afară de lipsa substanțelor inhibitoare asemenea nucleazelor, proteazelor şi enzimelor care hidrolizează nucleozid trifosfații, îl reprezintă procesul simplu de purificare al proteinei sintetizate realizat prin eliminarea proteinei marcate prin cromatografie de afinitate.

Una dintre limitările sistemului acelular o reprezintă degradarea ARNm-ului de provenienţă exogenă. Activitățile variate ale RN-azelor prezente în extractele celulare restricționează de obicei durata de viață a ARNm, şi consecutiv inhibă eficacitatea sintezei proteice. Această problemă ar putea fi rezolvată prin reintroducerea periodică în mixtura de reacție a unui sistem de translație simplu al mesagerilor [Madin şi colab., 2000]. Sistemele de cuplare ale transcripției cu translația, în care ARNm este continuu sintetizat din copia ADN adăugată la mixtura de reacție, se pot dovedi avantajoase pentru sistemele de translație care conțin mesageri presintetizați. Transcripția directă din mixtura de reacție poate fi relizată din promotori potriviți, de către ARN polimeraza endogenă din *E.coli* sau de către ARN polimeraza, bacteriofag exogen din sistemele bacteriene sau eucariote. Pentru a evita degradarea rapidă a mesagerilor, în special în sistemele acelulare *E.coli*, sunt folosiți inhibitori de RN-aze parțial lipsiți de ribonuclează. O alegere optimă de copie ADN în sistemele procariote o reprezintă plasmida circulară ADN. În sistemul bazat pe extracte de germeni de grâu cu activitate nucleazică scăzută, atât plasmidele ADN cât şi fragmentele lineare PCR au o funcționalitate optimă. Eficiența translației ARNm-ului depinde de

trăsăturile sale structurale. Majoritatea secvențelor de cADN sunt de regulă suficient de bine exprimate şi fără adiția suplimentară a potențiatorilor de translație. Secvenței care prezintă interes trebuie doar sa-i fie asigurată o secvență favorabilă Kozak pentru sistemele acelulare eucariote şi o secvență Shine-Dalgarno pentru cele procariote, care reprezintă secvențele codonului ATG responsabil de inițierea translației (Dingermann şi colab., 2004).

O altă problemă implicată în sinteza proteică acelulară o reprezintă consumul crescut de energie biochimică oferită de rezervele de ATP şi GTP. Atât creatin fosfatul cât şi creatin kinaza care sunt de obicei folosite pentru regenerarea ATP-ului şi GTP-ului în sistemele eucariote acelulare, sau combinația de PEP şi piruvat kinază, acetil fosfat şi acetat kinaza sau un amalgam al ambelor au fost aplicate modelului de sinteză bacteriană proteică *in vitro*. Sistemul generator de energie bazat pe acetil fosfat ar putea prezenta avantajul că nivelul de ATP este menținut de două ori mai mult în prezența PEP. Din moment ce acetat kinaza este prezentă în cantitate suficientă în extractele bacteriene, în sistemele bazate pe extracte de *E.coli* adăugarea exogenă a acesteia nu mai este necesară. Studii referitoare la nivelul de energie biochimică prezent în diferite sisteme acelulare a evidențiat un procent crescut al hidrolizei trifosfatului la mono- şi difosfați în timpul sintezei proteice atât în extractele de germeni de grâu cât şi în extractul S30 de *E.coli*. S-a demonstrat că peste 80% din hidroliza ATP-ului şi GTP-ului, din sistemele bazate pe extracte de germeni de grâu, se produce inițial independent de sinteza proteică şi a fost sugerat faptul că fosfatazele acide sunt responsabile de hidroliza nespecifică a nucleotid trifosfaților.

Studiile întreprinse cu scopul creşterii producției de proteine în reacțiile acelulare, s-au concentrat asupra compoziției mixturii de reacție, în special asupra compoziției în aminoacizi [Kim, Swartz, 2000] şi asupra metodelor de preparare ale extractului celular. Spre exemplu fosfatazele endogene au fost eliminate folosind extractul S30 preparat din sferoplastele de *E.coli* [Kang şi colab., 2000] sau prin imunodepleția fosfatazei. Tentativele de concentrare ale componentelor extractului prin ultrafiltrare sau prin dializă au fost de asemenea semnalate.

10.3.2. Tehnici de exprimare acelulară

În reacțiile acelulare desfăşurate într-un mod discontinuu , condițiile de reacție se modifică ca rezultat al consumării substratului şi al acumulării de produşi. Procesul de translație se opreşte de îndată ce orice substrat esențial este epuizat. De fapt, sistemele bacteriene acelulare sunt active doar pentru 10-30 min la 37°C. Sistemele bazate pe reticulocite lizate de iepure sau germeni de grâu sunt capabile de funcționare pe intervale de până la o oră. Cu toate acestea, sistemele de sintetizare a proteinelor *in vitro*, sisteme cu modalitate de lucru discontinuă funcționează optim pentru majoritatea scopurilor analitice, însă durata scurtă de viață şi productivitatea scăzută le limitează aplicabilitatea în ceea ce priveşte sinteza unor cantități prestabilite de proteine. Motivele productivității scăzute sunt reprezentate de degradarea ARNm, depleția nucleotid trifosfaților şi acumularea produşilor de hidroliză. Timpi prelungiți de reacție pentru sistemele de expresie acelulare au fost inițial obținuți prin utilizarea unui dispozitiv de translație cu flux continuu acelular (CFCF) (fig. 10.2A). Ideea de bază este aceea de a asigura continuu aminoacizi, elemente regeneratoare ale energiei (AcP, CrP sau PEP) şi NTPs printr-o soluție nutritivă, şi de a elimina continuu produşii micromoleculari (în special produşi obținuți prin hidroliza trifosfatului asemenea fosfaților anorganici şi nucleozid monofosfații) printr-un flux activ (forțat) al soluției nutritive printr-o membrană de ultrafiltrare (greutatea moleculară este redusă în limitele a 10-300 kDa). În acest caz, toți produşii, inclusiv proteinele sintetizate, sunt permanent eliminate din compartimentele de reacție dacă mărimea porilor este suficient de mare (fig. 10.2A). Amestecarea permanentă a mixturii de reacție şi în anumite contexte aplicarea metodei fluxului ascendent asupra soluției nutritive sunt aplicate pentru reducerea formării aglomerărilor membranare.

Sistemul CFCF poate funcționa peste 20 de ore şi are drept rezultat producția proteică de circa 0,1-1 mg proteine/ml de volum de reacție ori mai mult. Modelul pentru acest sistem poate fi reprezentat fie de ARNm, ADN-ul transcripționat de ARN polimeraza bacteriană endogenă, sau de adăugarea bacteriofagul ARN polimeraza sau a ARN-ului auto-replicativ. Folosind sistemul CFCF, au fost

sintetizate cu succes proteine cum ar fi, proteina de acoperire bacteriofagul MS2, proteina de acoperire a virusului brom mozaicat, polipeptid calcitonina, globina, dihidrofolat reductaza funcţional activă (DHFR), cloramfenicol acetiltransferaza (CAT), interleukinele (IL)-2 şi IL-6 .

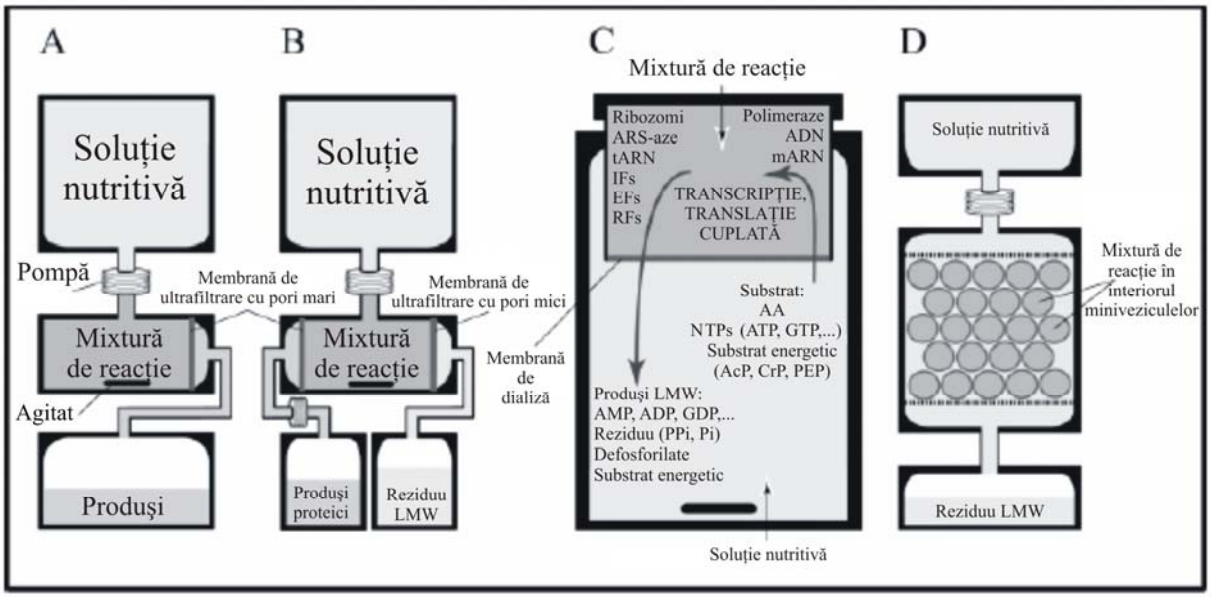


Fig. 10.2 Ilustrarea reactoarelor acelulare pentru sistemele acelulare de flux continuu (A şi B) şi schimb continuu (C şi D). Ilustrarea schematică a unui reactor CFCF cu flux continuu unde elementele de substrat sunt pompate iar produşii sunt eliminaţi prin filtrarea forţată a soluţiei nutritive printr-o pompă. (B) Reactorul CFCF cu flux Y, care conţine două membrane de ultrafiltrare cu pori de dimensiuni diferite, care separă produşii proteici de reziduurile cu greutate moleculară mică. (C) Reactorul CFCF ilustrat cu explicitarea soluţiei nutritive (gri deschis) şi componentele mixturii de reacţie (gri închis). Compartimentele sunt separate printr-o membrană de dializă semipermeabilă, care permite schimburile de difuziune ale substratului şi ale produşilor cu greutate moleculară mică precum şi retenţia componentelor mixturii de reacţie. (D) Reactorul coloană pentru fluxul de schimb alcătuit din mini-vezicule grupate în coloană, conţinând mixtura de reacţie, înconjurate de soluţia nutritivă, modificate de fluxul din coloană. Produşii cu greutate moleculară mică şi substratele sunt modificate de difuziunea prin membrana mini-veziculelor. Modificat după Shirokov şi colab. [Shirokov şi colab., 2002].

Avantajul major al sistemului CFCF îl reprezintă extragerea permanentă a proteinelor sintetizate din mixtura de reacţie , ceea ce se poate solda cu o puritate de 80- 85% a produsului proteic aşa cum am demonstrat, permanent prin filtrarea într-un sistem bacterian CFCF sintetizator de DHFR şi într-un sistem CFCF bazat pe extract de germeni de grâu, sintetizator de IL-6. Proteina sintetizată difuzează din reactorul CFCF într-o cantitate considerabilă şi este destul de diluată. Pentru a reduce efectul

de diluție a fost propusă folosirea aşa numitului reactor cu flux în Y, având caracteristic o separare a fluxului.

Reactorul cu flux Y (fig. 10.2B) are două membrane cu pori de dimensiuni diferite. Inițial, produşii cu greutate moleculară mică sunt transportați printr-o membrană cu pori mici, la o rată crescută, iar proteina sintetizată este colectată în consecință şi transportată printr-o membrană cu pori mari la o rată scăzută. Aici, fluxul produsului proteic este controlat de o pompă de separare. Cu toate acestea un număr mare de tentative laborioase de realizare a sistemului CFCF au întâmpinat dificultăți în elaborarea şi calibrarea acestui sistem complex. Problemele principale sunt reprezentate de degradarea ARN consecutivă folosirii extractelor bacteriene, chiar şi în modele de cuplare ale transcripției cu translația şi eficacitatea scăzută a formării complexului de inițiere, care poate cauza scurgeri şi prin urmare pierderea unor componente ale procesului de translație prin ultrafiltrare sau blocarea membranei de ultrafiltrare. Cu toate acestea, există o cale alternativă de îndeplinire a sintezei proteice prelungite, care foloseşte în special difuziunea în loc de pomparea rezervelor de substrat şi eliminarea produşilor cu greutate moleculară mică (fig. 10.2C). Acest sistem care foloseşte o mixtură de reacție separată de soluția de hrănire prin aplicarea unei membrane de dializă, este denumit sistem acelular de schimb continuu (CECF) ori sistem acelular cu flux semicontinuu (SFCF). Cel mai simplu dispozitiv de asigurare permanentă a substratului şi de eliminare a produşilor cu greutate moleculară mică folosind schimbul pasiv cu o mixtură nutritivă, este reprezentat de o pungă de dializă. În practică, pungile de dializă, simple, fabricate manual sau dializoarele standard comerciale, cum sunt MicroDialyzer® sau DispoDialyzer® de la Spectrum se pot utiliza cu succes. Dimensiunea porilor membranelor reactoarelor este de regulă situată între 10- 50kDa. Cu toate acestea au fost raportate şi performanțe bune ale reactoarelor cu membrană cu dimensiuni mai crescute ale porilor. Amestecarea doar a soluției de hrănire sau atât a soluției de hrănire cât şi a mixturii de reacție este necesară pentru asigurarea unor rezerve eficiente de substrat. Folosind această abordare s-a observat sinteza a 1,2mg/ml de CAT pe durata a 14 ore din extractul S30 de *E.coli*. Obținerea acestui produs,

cuantifiactă prin ELISA, a depăşit cantitativ producția obținută prin reacția analog discontinuă de 10 până la 12 ori. Apoi s-a reuşit sinteza proteinelor CAT şi Ras în cantități de până la 6mg/ml pe o perioadă de 18 ore folosind varianta lor de sistem bacterian CECF, iar Madin şi colab. (2000) au atins producții de 1-4 mg/ml pentru mai multe proteine active funcțional precum DHFR, proteina verde fluorescentă (GFP), luciferaza sau ARN replicaza a virusului mozaicul tutunului (TMV). Figura 10.3 descrie sinteza acelulară a GFP printr-o metodă CECF care utilizează un MicroDialyzer®.

Avantajul sistemului CECF este reprezentat de acumularea produşilor sintetizați în mixtura de reacție. Sinteza de proteine şi polipeptide fuzionate cu GFP oferă o modalitate directă şi înalt demonstrativă de a vizualiza acumularea de produs prin intermediul fluorescenței jumătății GFP a complexului. Sinteza unei proteine HIV, aşa numitul antigen Nef, fuzionată cu GFP [Chekulayeva şi colab., 2001] şi a unei polipeptide antibacteriane Cecropina P1 fuzionată cu GFP [Martemyanov şi colab., 2001], au fost raportate într-un sistem bacterian de transcripție/translație CECF T7.

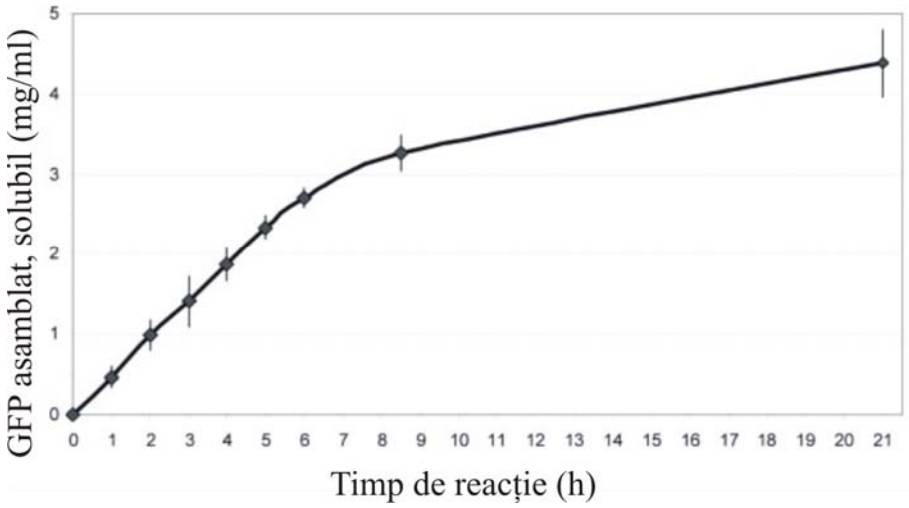


Fig. 10.3 Sinteza acelulară a GFT într-un sistem bacterian CECF folosind un MicroDialyzer® de 100 µl. Punctele kinetice arată media a trei reacții iar barele de eroare indică deviația mediei. Reacția a fost realizată la 30°C folosind o mixtură nutritivă de 17 straturi comparativ cu volumul mixturii de reacție şi sub următoarele condiții de reacție: 0,05% NaN_3, 2% fosfoenolglicol, 196 µM acid folinic, 2mM 1.4-ditiotreitol, 1,2 mM ATP, 0.8 mM din următoarele: CTP, GTP şi UTP, 20mM acetil fosfat, 1mM din fiecare aminoacid cu excepția argininei, acidului aspartic, cisteinei , acidului glutamic, metioninei şi triptofanului din care au fost utilizați 2mM, 100mM HEPES-KOH (pH 8.0), 2,8mM EDTA, 1X inhibitor complet de protează (Roche), 280mM K^+, 13mM Mg^{2+}, 40µl/ml piruvat kinaza, 500µg/ml tARN (*E.coli*), 3U/µl T7-ARN polimeraza, 0.3 U/µl RNasin, 35% extract S30 (*E.coli*) şi 15µg/ml plasmidă.

De asemenea cu ajutorul unor reactoare s-a combinat atât tehnica de schimb cât şi cea de flux. În una dintre aceste versiuni, mixtura de reacţie este încapsulată în minivezicule polizaharide care se pot dispune în coloană, şi în care soluţia nutritivă este vehiculată prin coloana respectivă (fig. 10.2.D). În acest caz schimbul produs-substrat de-a lungul pereţilor veziculelor are loc în cursul fluxului. Versiuni mai sofisticate ale reactorului CECF sunt azi în curs de dezvoltare pentru obţinerea unor prototipuri care să corespundă cerinţelor oamenilor de ştiinţă şi biotehnicienilor. Primul reactor CECF comercial a fost lansat de curând pe piaţă de către Roche Diagnostics. Sistemul CECF Roche oferă o producţie mare de proteine de peste 2mg/ml.

Alte siteme comerciale au la bază sistemul de creştere discontinuu, în care nutrientul este adăugat în totalitate de la început, dar şi ele au cunoscut recente şi reale îmbunătăţiri. Spre exemplu a fost propus un sistem inovator de regenerare a NTP, care să evite acumularea de fosfaţi anorganici prin adăugarea de piruvat oxidază, care generează AcP din piruvat şi fosfaţii anorganici direct în mixtura de reacţie. Ulterior s-a demonstrat că adiţia de oxalat, un inhibitor potent al PEP sintetazei, va creşte substanţial producţia de CAT sintetază prin îmbogăţirea rezervei de ATP cu circa 47% [Kim, Swartz, 2000]. Mai mult Kim şi Swartz (2000) au reuşit prin cultivări în sistem semidiscontinuu (fed-batch), cu adăugarea treptată de nutrient limitator al creşterii, în care adăugarea coordonată de PEP, magneziu şi aminoacizii: arginina, cisteina şi triptofan, permite obţinerea unei concentraţii finale de CAT sintetizat acelular de aproximativ patru ori mai mare decât într-un sistem discontinuu (batch). Drept rezultat al acestor îmbunătăţiri a devenit posibilă sintetizarea a circa 350µg/ml CAT sau 450µl/ml de proteină recombinantă umană trombopoietina printr-o reacţie de tip discontinuu.

10.3.3 Aplicaţii specifice ale tehnicii de marcare acelulară

Tehnicile convenţionale de marcare *in vivo* sunt adesea urmate de producţii scăzute de proteine datorate creşterii întârziate pe un mediu minimal iar, în cazul marcării izotopice selective, datorită efectului de amestecare ce reduce drastic

eficacitatea şi selectivitatea marcării. Prin urmare un avantaj major al tehnicilor de marcare acelulare îl reprezintă absența oricărul efect de amestecare sau conversie metabolică a aminoacizilor marcați [Betton şi colab., 2002]. Încorporarea selectivă a aminoacizilor în proteine sintetizate acelular destinate cercetării RMN a fost deja demonstrată în repetate rânduri [Guignard şi colab., 2002]. Similar în tehnica reversă a marcării izotopice, majoritatea aminoacizilor sunt simplu sau dublu (N^{15}, C^{13}) marcați, excepție făcând câteve reziduuri.

Figura 10.4 (A) ilustrează spectografia heteronucleară 2-D H^1-N^{15}, cu spectru RMN, utilizând un singur spectru de corelare (HSQC) pentru evaluarea domeniului C-terminal de legare a ADN al factorului reglator transcripțional RcsB (cRcsB), generat acelular şi marcat izotopic reversibil, care a fost uniform marcat cu N^{15} cu excepția resturilor de asparagină (N) şi glutamină (Q). cRcsB marcat uniform cu N^{15} şi exprimat *in vivo* este reprezentat în fig. 10.4(B). Spectrul 2-D H^1-N^{15} HSQC al proteinei marcate cRcsB sintetizate *in vitro* este în concordanță cu cel al proteinei sintetizate *in vivo*, uniform marcate (excepție făcând vârfurile de asparagină şi glutamină care lipsesc în sistemul *in vitro*).

Exprimarea în sistem acelular este extrem de potrivită pentru generarea de mostre de proteine marcate doar la nivelul unor resturi distincte de aminoacizi. Marcarea unor situsuri specifice este extrem de utilă pentru simplificarea procedurilor de observare şi de distribuire a rezonanței aminoacizilor a unor resturi prestabilite de aminoacizi care prezintă un interes particular, şi îşi poate de asemenea dovedi utilitatea în analiza structurilor locale ale macroproteinelor şi a interacțiunilor proteină-proteină. Încorporarea unui reziduu specific, marcat C^{13} la nivelul unui codon stop prin translatarea secvenței modificate într-un sistem *in vitro* suplimentat cu supresorul încărcat ARNt a permis detectarea reziduurilor marcate prin spectroscopie RMN în urma denaturării şi reasamblării proteice. Cantități de ordinul miligramelor de proteină marcată izotop specific la nivelul unui situs pot fi obținute într-un sistem acelular implicând strategia de supresie a unei secvențe specifice de codon stop, secvența UAG. Supresorul *E.coli* al secvenței codonice, ARNt, poate fi preparat prin transcripție *in vitro* cu T7 ARN polimeraza şi ulterior prin adăugare de

aminoacil, prin introducerea amino ARS-azei *E.coli*, potrivit purificată, şi a aminoacidului marcat specific. Codonul specific pentru restul de aminoacid selectat din proteină a fost anterior modificat într-un codon UAG (codon stop) prin tehnici standard.

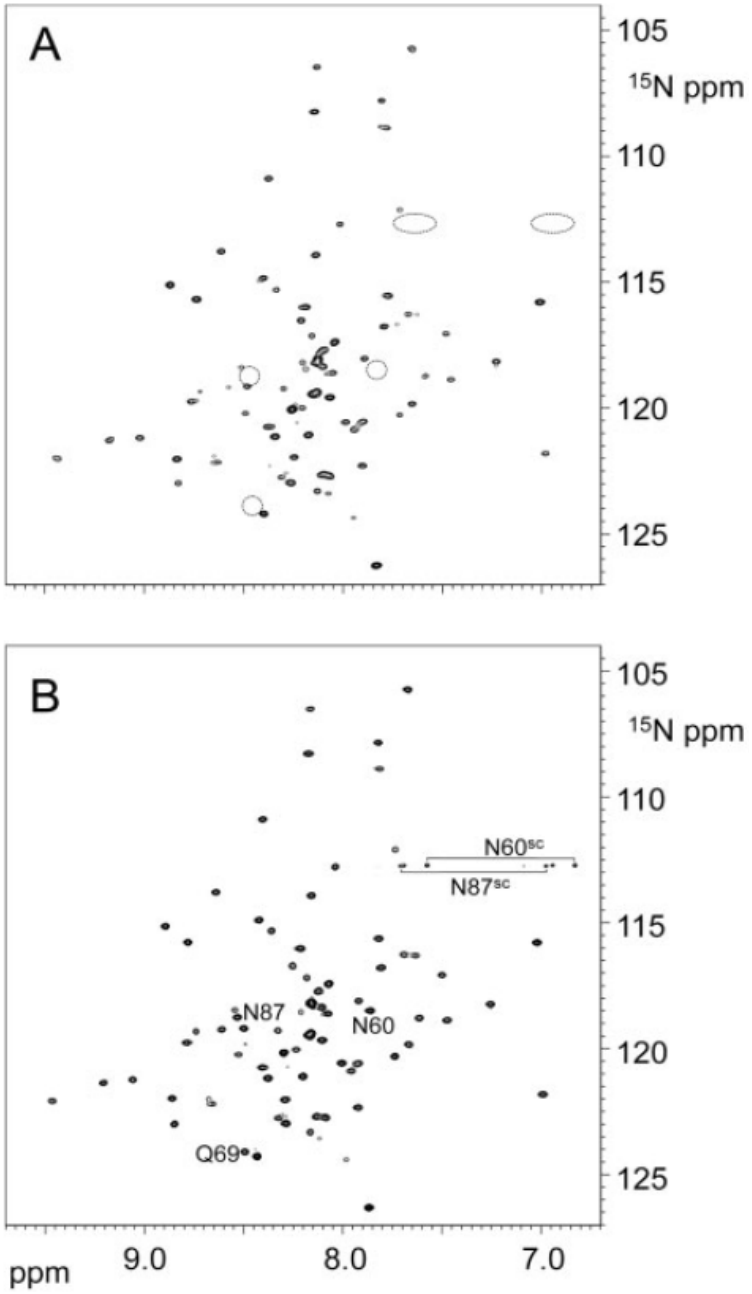


Fig. 10.4 Comparaţie între spectrul 2-D HSQC H^1-N^{15} al generărilor *in vitro* şi *in vivo* ale domeniului C-terminal purificat al factorului bacterian reglator transcripţional RcsB (cRcsB) folosind un spectometru Bruker DRX-800 MHz RMN cu o crioprobă. (A) Marcarea acelulară cu izotop N^{15} a cRcsB sintetizat într-un sistem CECF optimizat, utilizând un DispoDialyzer®. Toţi aminoacizii cu excepţia asparaginei (N) şi glutaminei (Q) au fost marcaţi cu N^{15}. Cum era de aşteptat, resturile de N şi Q (cercuri) sunt absente în spectrul 2-D HSQC H^1-N^{15}.(B) cRcsB exprimat *in vivo* uniform marcat izotopic cu N^{15}. Acest spectru este în bună dependenţă cu cRcsB marcat izotopic generat acelular, iar resturile de N şi Q pot fi uşor identificate. (după Dingermann şi colab., 2004).

Marcarea segmentară *in vivo* este limitată de cerințele specifice cum ar fi, organizarea proteinei țintă în domenii, prezența reziduurilor specifice şi problemelor de asamblare. Pavlov şi colab., (1997) au pus la punct o tehnică acelulară bazată pe translația *in vitro* a mARNs matrix-cuplate, care în principal este lipsită de orice cerință conformațională sau la nivelul secvențelor. Dimensiunea regiunii marcate este controlată prin folosirea codonilor fără a exista o limită superioară intrinsecă a dimensiunii proteinelor care pot fi marcate izotopic la nivelul regiunii selectate. Această metodă are la bază folosirea mixturilor de translație lipsite fie de un aminoacid şi/sau de ARNt propriu şi/sau de amino ARS-aza în trei etape. Folosirea de copii ARN cuplate columnar face ca mixtura de reacție să fie uşor schimbabilă. Inițial regiunea nemarcată N-terminală, cu ajutorul unei mixturi de reacție nemarcate, este sintetizată până la primul codon fără existența unui amino acil-ARNt potrivit în extract. La acest nivel datorită pauzei ribozomale mixtura de translație poate fi înlocuită cu o alta conținând aminoacizi marcați izotopic, aceasta din urmă deficitară în alt aminoacid, ARNt sau amino ARS-ază. Translația se reia, marcând în consecință regiunea până ce ribozomii întâlnesc următorul codon lipsit de ARNt corespunzător. În ultima etapă, porțiunea C-terminală este sintetizată fară să fie marcată iar proteina este eliberată de ribozom. Cu toate acestea tehnica a avut drept rezultat producții scăzute de proteine, putând în cel mai bun caz, produce determinarea stoichiometriei proteice pentru ARNm imobilizat.

Un avantaj, destul de promițător al marcării izotopice acelulare îl reprezintă posibilitatea efectuării măsurătorilor RMN *in situ* aşa cum ne descriu Guignard şi colab.,(2002). Aceştia au prezentat analize RMN ale proteinelor sintetizate *in vitro* fără a folosi purificări cromatografice şi cu o manevrare minimă a probelor utilizând un reactor CECF optimizat la care s-a adăugat sensibilitatea unei crioprobe. Aşa cum era de aşteptat, ei nu au observat nici o urmă de trecere pentru nici un aminoacid marcat N^{15} şi doar proteina țintă a fost îmbogățită cu resturile izotop marcate. Ei sugerează o nouă posibilitate de analiză proteică rapidă şi economică aplicabilă pe scară largă în proteomică, în care proteinele selectiv marcate pot fi expimate în 0,5 ml de mediu de reacție, utilizând cantități reduse de aminoacizi marcați şi pretabilă

analizei RMN. Toate etapele de la exprimare până la efectuarea spectrului RMN complet au fost finalizate în mai puțin de 24 de ore.

Datorită avantajelor excepționale ale sintezei proteice acelulare, marcarea izotopică poate fi obținută şi pentru proteine care sunt în mod normal dificil de exprimat. Utilizând tehnici de marcare acelulare poate deveni posibilă sintetizarea unor proteine marcate izotopic care sunt toxice, tehnici ce necesită cofactori sau chaperone pentru adoptarea unei conformații active, sau chiar a proteinelor membranare. Marcarea subunităților de oligomeri, cercetările mai amănunțite asupra formării punților disulfidice sau oxidarea proteică sunt tehnici care probabil vor deveni posibile în viitorul apropiat.

CAPITOLUL 11

UTILIZAREA FRAGMENTELOR DE ANTICORPI CA MEDIATORI AI CRISTALIZĂRII PROTEINELOR MEMBRANARE ÎN VEDEREA DESCOPERII DE NOI MEDICAMENTE

11.1. Introducere

O dată cu decodarea genomului uman şi după ce au devenit disponibile din ce în ce mai multe genomuri ale organismelor patogene, cum ar fi Helicobacter pylori, Mycobacterium tuberculosis şi Plasmodium falciparum, au crescut speranțele legate de stimularea descoperirii de noi medicamente. Deoarece majoritatea genelor acționează la nivelul proteinelor, acum se fac eforturi uriaşe în proiecte de genomică structurală pentru accelerarea determinărilor experimentale ale structurii proteinelor prin intermediul cristalografiei cu raze-X şi rezonanței magnetice nucleare. În descoperirea medicamentelor sunt utilizate structuri intens disociate: (1) prin modelarea rațională a medicamentelor; (2) prin analiza complexelor structurale țintă – ligand pentru validarea variantelor reuşite sau pentru îmbunătățirea rațională a liganzilor care au fost obținuți prin screening-ul sistematic al băncilor de compuşi rezultați prin procedee chimice combinatoriale; sau (3) prin screening-ul liganzilor *in-silico* ce permite reducerea costurilor experimentelor şi accelerează descoperirile. În final, dar nu în ultimul rând, structurile intens disociate sunt sursa unor informații esențiale pentru înțelegerea mecanismelor moleculare ale proteinelor ce acționeză în celule într-o mare varietate de structuri specifice care constituie baza funcțiilor lor foarte diverse.

Cea mai utilizată metodă pentru determinarea structurii atomice a proteinelor cu masa moleculară mai mare de 30kDa (inclusiv proteine membranare) este

cristalografia cu raze-X, pentru care sunt necesare cristale bine coordonate tridimensional (3-D) provenite din soluții proteice.

În ciuda interesului foarte mare pentru structura proteinelor membranare (ținte moleculare pentru majoritatea medicamentelor), după 1985 când a fost prezentată prima structură a unei proteine membranare a centrului reactiv de fotosinteză la o bacterie s-au determinat până acum structurile integrale pentru mai puțin de 50 de proteine membranare.

Moleculele detergenților sunt amfofile, fiind alcătuite dintr-o extremitate (un capăt) polarizată sau încărcată electric şi o coadă hidrofobă. La concentrații mici, detergenții sunt prezenți în soluții apoase sub formă de monomeri şi formează un monostrat la interfața lichid – aer. Peste o anumită concentrație a detergentului, denumită concentrație micelară critică (CMC), se formează micelii prin inter-asocieri. În alcătuirea acestor agregate sferice, cozile hidrofobe ale moleculelor de detergenți sunt orientate către interiorul miceliilor iar grupările de la extremitatea hidrofilă se orientează către exterior. Proteinele membranare sunt solubile în soluții micelare de detergenți şi formează complexe proteină – detergent. Un miceliu detergent acoperă suprafața hidrofobă a proteinei membranare ca un brâu, în acest caz, grupările de la extremitățile polarizate orientându-se către faza apoasă (fig. 11.1)

Pornind de la complexele detergent – proteină, proteinele membranare pot fi reconstituite într-un bistrat fosfolipidic prin îndepărtarea detergentului şi adăugarea concomitentă a fosfolipidelor prin dializă sau prin adsorbție în fază solidă. În anumite condiții determinate empiric proteinele respective formează structuri bine ordonate, bidimensionale (2-D), aşa numitele cristale 2-D care pot fi utilizate pentru determinarea structurii prin microscopie electronică [Dingermann şi colab.,2004]. Astfel, au fost obținute structurile câtorva proteine membranare la rezoluție medie (în jur de 5 – 10A). Determinări structurale la rezoluții apropiate de cele atomice prin microscopie electronică sunt posibile dar sunt anevoioase. Încercările experimentale de cristalizare 2-D necesită cantități mai mici de proteine iar obținerea cristalelor prin această metodă ar putea fi mai rapidă.

Totuşi, atunci când pot fi obținute cristale 3-D de bună calitate, determinarea rapidă a structurii la rezoluție mare prin cristalografie cu raze X este mult mai eficientă. Caracterul amfifil al suprafeței proteinelor membranare permite formarea cristalelor 3-D în două moduri (vezi fig. 11.1).

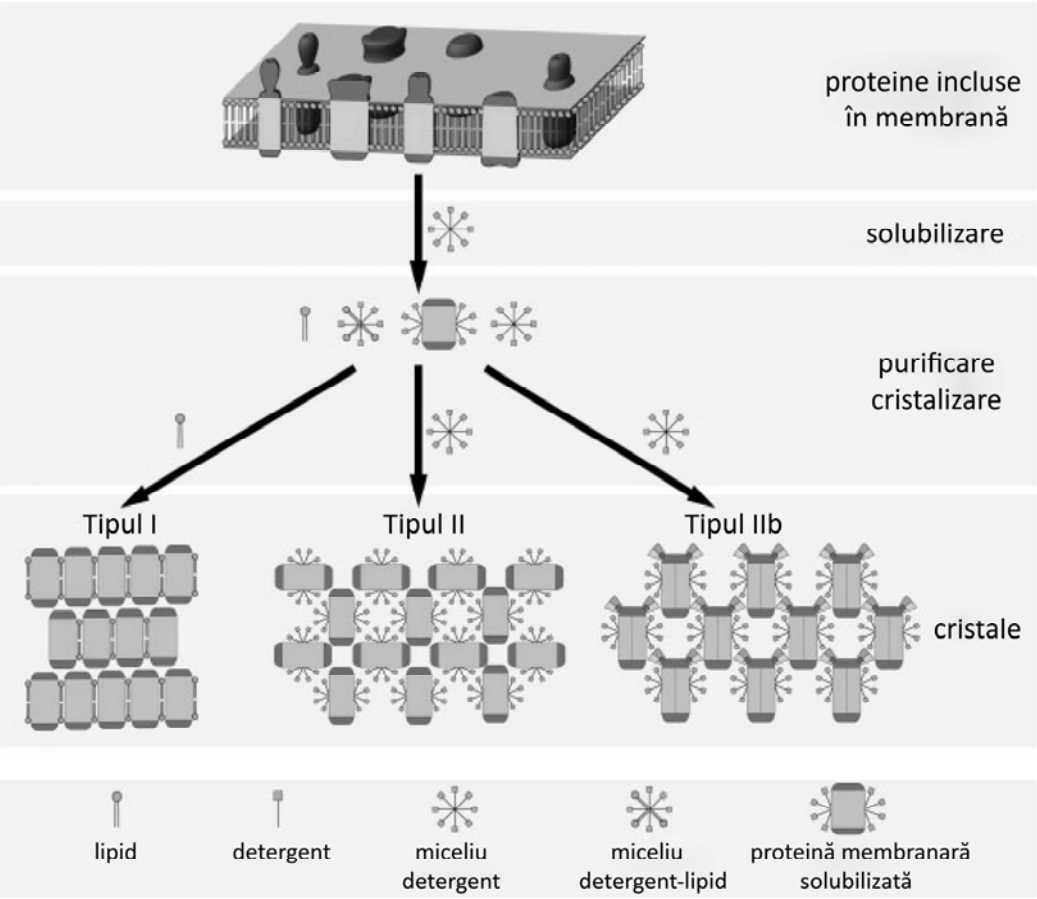


Fig. 11.1. Tipurile elementare de cristale 3-D ale proteinelor membranare. Cristalele tip I sunt constituite din straturi ordonate de cristale 2-D care sunt prezente în bistrat. Suprafețele hidrofobe ale proteinelor membranare sunt acoperite de un miceliu în conformație solubilizată prin detergent. Aceste complexe detergent-proteină membranară formează aşa-numitele cristale 3-D tip II. Contactele de legătură stabile din cristale se formează între suprafețele hidrofile ale proteinei. Într-o formă modificată a tipului II (tip IIb), fragmente de anticorp legate strâns şi specific adaugă un domeniu hidrofil complexului. Aceste expansiuni ale suprafeței conferă noi situsuri pentru contacte de legătură şi spațiu pentru miceliile detergent.

Cristalele de tip I sunt în principiu straturi suprapuse ordonat de cristale 2-D ce conțin moleculele proteice ordonate între aceste planuri. Cristalele de tip II se pot forma prin integrarea proteinelor membranare în micelii de detergenți într-un mod asemănător proteinelor solubile. În acest din urmă caz asamblarea cristalelor se face prin intermediul suprafețelor polare ale acelor domenii ale proteinelor care proemină

din miceliul detergent. În acest caz condițiile de cristalizare sunt foarte similare acelora pentru proteinele solubile. Este posibilă şi formarea cristalelor mixte tip I şi II, deşi cele mai multe cristale ale proteinelor membranare aparțin tipului II.

Evident, miceliile de detergent necesită spațiu în matricea cristalelor. Deşi forțele de atracție dintre micelii permit stabilizarea structurii cristaline, acestea nu pot contribui la constituirea contactelor de legătură rigide din cadrul structurii cristaline. Astfel, sunt dificil de cristalizat în mod special proteine cu domenii hidrofile mici, cum ar fi multe proteine transportoare sau proteine canal care sunt alcătuite în principal din porțiuni transmembranare helicoidale şi bucle foarte scurte expuse mediului solvent. O metodă menită să crească probabilitatea de a obține cristale de tip II bine ordonate este creşterea suprafeței polare a proteinei membranare prin ataşarea de domenii polare cu fragmente de anticorpi cu legare specifică. Această metodă dezvoltată de Michel şi colab.,(2001) a fost pentru prima dată aplicată cu succes pentru cristalizarea şi determinarea structurii Citocrom C oxidazei (COX) din Paracoccus denitrificans legat cu un Fv (fragment variabil) de anticorp.

Pe lângă cerințele specifice pe care trebuie să le îndeplinească un detergent pentru cristalizarea 3D a proteinelor membranare, a doua problemă în cadrul analizei structurale este procurarea unor cantități suficiente de proteine. Cristalizare 3D presupune consumul a cel puțin 10 mg de proteină pură per etapă de examinare. Aproape toate structurile proteinelor de membrană care au fost determinate aparțin proteinelor ce se găsesc în cantități mari în mediul lor natural, cum ar fi proteinele lanțului respirator sau de membrane fotosintetice. Totuşi, majoritatea proteinelor membranare cum ar fi receptorii şi proteinele transportoare sunt prezente intracelular în concentrații mici. Prin folosirea sistemelor de producție bazate pe recombinare, inserția proteinei într-o membrană limitează eficiența producției, cu excepția cazurilor în care decidem producerea prin intermediul formării corpului de incluzie şi repliere. Ultima metodă a fost aplicată cu mult succes pentru proteine membranare β – barrel foarte stabile, din membranele bacteriene externe. S-au realizat progrese însemnate în aplicarea sistemelor de supraexpresie pentru proteine membranare cu origine bacteriană, ca de exemplu pentru determinarea structurii canalului ionic

mecano-senzitiv din M. Tuberculosys produs în Escherichia Coli. Este foarte importantă dezvoltarea în continuare a sistemelor de supraexpresie la nivel înalt pentru producerea de proteine membranare recombinate din eucariote pentru explorarea cu succes a structurii acestora. În plus, tehnicile de recombinare au avantajul că proteinele pot fi proiectate să fie sintetizate cu terminații de afinitate ce permit o purificare facilă. De asemenea, secvența poate să fie modificată pentru a conferi o sursă proteică omogenă ca de exemplu prin îndepărtarea situsurilor de glicozilare. Mai mult, cu secvențele genomice disponibile în număr din ce în ce mai mare, sistemul de recombinare permite o nouă abordare: evaluarea expresiei şi purificarea proteinelor omoloage din câteva organisme prin testarea proprietăților de cristalizare a acestora. Pentru determinarea cu succes a structurii canalului mecanosenzitiv MscL au fost supuse unor experimente de cristalizare omologi proveniți de la 9 specii procariote. Proteinele omoloage provenite de la diferite specii au nu numai proprietăți esențiale diferite cum ar fi stabilitatea proteinei sau capacitatea de producție, dar pot prezenta şi mici variații ale proprietăților de suprafață ce pot fi responsabile pentru reuşita cristalizării, deoarece contactele de legătură în cristal sunt mediate prin suprafața proteinei.

În acest capitol, ne vom concentra asupra descrierii metodei de cristalizare a proteinelor membranare mediată prin fragmente de anticorpi, această abordare promițătoare fiind deja folosită cu succes pentru determinarea structurii a 5 complexe proteină membranară – anticorp.

11.2. Cristalizarea proteinelor membranare mediată prin fragmente de anticorp

11.2.1. Considerații generale

După aplicarea cu succes a cristalizării mediate prin fragmente de anticorp pentru COX (cicloxigenaza)bacteriană, metoda a fost utilizată pentru determinarea structurilor câtorva proteine membranare, ce vor fi prezentate mai jos.

COX din *P. denitrificans* a fost cristalizat sub formă de complex cu un fragment Fv de anticorp recombinat. A fost determinată structura acestui complex la

o rezoluție de 2,8Å, compusă din toate cele patru subunități ale COX şi cele două polipeptide ale fragmentului Fv. Fragmentele Fv sunt implicate în toate contactele de legătură din cristal. Totuşi, lipsa interacțiunilor directe proteină – proteină pe axa-*c* determină anizotropie în difracție şi dificultăți de reproducere a cristalelor. S-au obținut cristale mai bine ordonate printr-o sinteză a COX ce conține numai cele două subunități catalitice esențiale I şi II. Cristalele produc difracția razelor X la o rezoluție mai mică de 2,5Å. Noul mod de asamblare al cristalului implică interacțiunea directă dintre suprafețele citoplasmatică şi periplasmatică cu moleculele COX adiacente. Toate celelalte contacte sunt mediate exclusiv prin intermediul fragmentului Fv. În toate aceste structuri, complexul COX-Fragment Fv a fost purificat prin cromatografie indirectă de imunoafinitate (a se vedea mai jos). Complexul este format prin combinarea membranelor solubilizate cu periplasmă ce conține fragment Fv şi apoi este purificat într-o singură etapă prin cromatografie de afinitate cu streptavidină, folosindu-se secvența terminal strep (strep-tag) fuzionată la fragmentul Fv.

A doua proteină membranară cristalizată prin această tehnică este complexul citocrom bc_1 (QCR) din drojdie, o componentă fundamentală a lanțului respirator mitocondrial. Ca şi în cazul COX bacteriene, complexul a fost cristalizat cu un fragment Fv recombinat. Acesta din urmă se leagă la domeniul extrinsec al subunității catalitice Rip1p, aşa numita proteină Rieske.

Anticorpul monoclonal parental 18E11 a fost obținut prin tehnici standard de hibridom prin imunizarea şoarecelui cu QCR din drojdie solubilizat cu detergent şi purificat . Anticorpul nu recunoaşte proteina în Western Immunoblot după separarea complexului prin electroforeză în gel poliacril amidă-duodecil sulfat sodic (SDS-PAGE), dar se leagă de un epitop discontinuu nativ. Deşi acest complex format din mai multe subunități (230kDa per monomer) are un domeniu hidrofil mare ce pătrunde în spațiul matriceal (aproximativ 86kDa) şi o porțiune hidrofilă destul de mare prezentă în spațiul intermembranar (aproximativ 46kDa), cristale de QCR din drojdie adecvate pentru analiza în raze-X au fost obținute doar în complex cu fragment Fv. Structura complexului a fost determinată la rezoluție de 2,3Å.

Fragmentele Fv legate au determinat o asamblare spațială rarefiată a cristalului (grup spațial C2) cu un conținut ridicat de solvent de 74%, făcând loc miceliilor – detergent de mari dimensiuni ale detergentului undecilmaltopiranozidă (fig. 11.2). Principalele contacte de legătură în cristal sunt mediate prin fragmente de anticorp. Acelaşi mod de lucru a fost utilizat şi pentru cristalizarea QCR din drojdie cu legătura substratului său citocromul *c*. Condițiile de cristalizare diferite au determinat alterarea rețelei cristaline (P21). Din nou, fragmentele Fv au avut contribuția majoră în interacțiunile dintre moleculele adiacente. Acestea nu au stânjenit nici legarea citocromului *c* şi nici nu au interferat cu activitatea QCR (Dingermann şi colab.,2004).

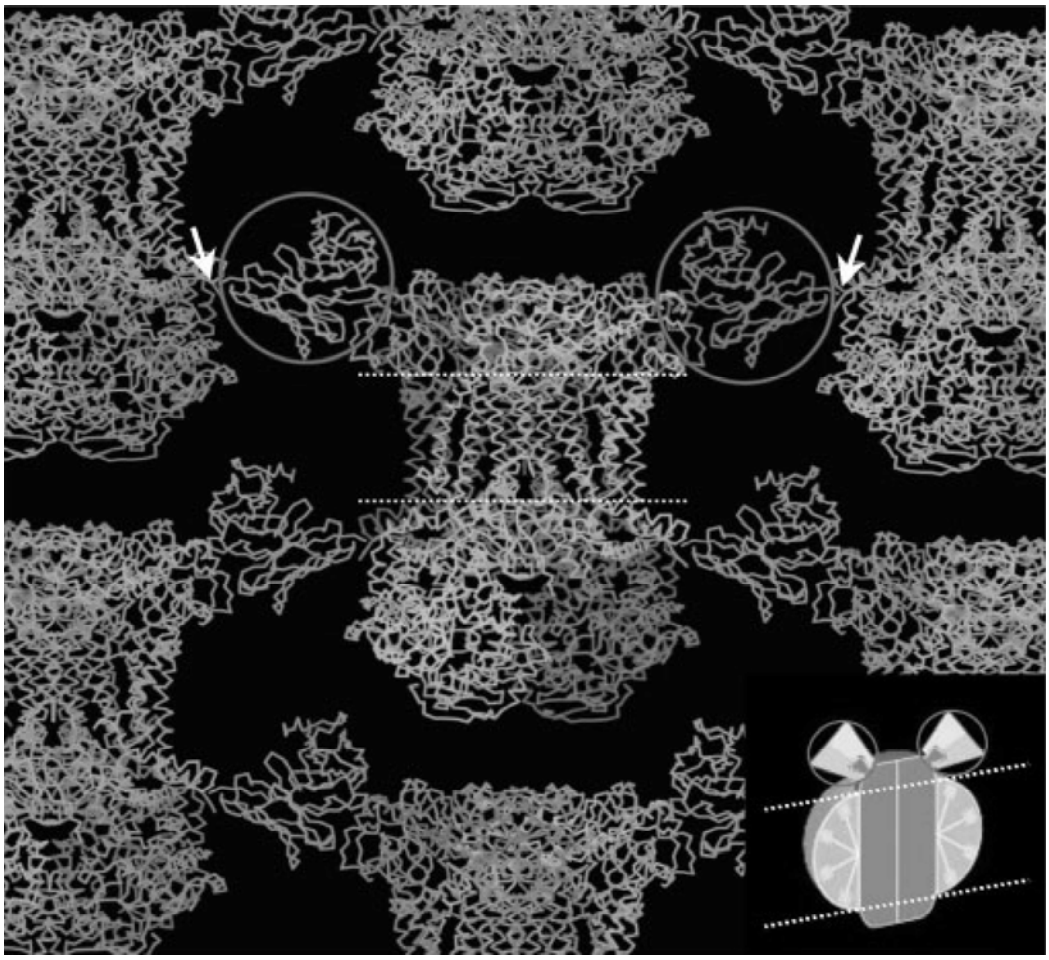


Fig. 11.2 Fragmentele de anticorp sunt esențiale pentru cristalizarea citocromului bc_1 din drojdie, contactele de legătură ale cristalului (săgețile albe) din co-complexul Fv18E11 – complex citocrom bc_1 din drojdie fiind mediate de fragmentul Fv (încercuit). Fragmentul se leagă de domeniul extrinsec al subunității Rip1p şi oferă spații ample pentru miceliile detergent în care este împachetată porțiunea transmembranară a complexului (linii punctate), prezentată schematic în detaliu.

Cristalizarea şi determinarea structurii canalelor de potasiu KcsA a fost realizată prin legarea unui fragment *Fab (fragment antibody binding)*. Anticorpul monoclonal utilizat a fost obținut prin tehnologia hibridomului iar clonele au fost selectate pentru recunoaşterea formelor native homotetramerice, nu şi a celor monomerice ale canalului. Cristalizarea s-a efectuat cu fragmente Fab proteolitice obținute prin proteoliză cu papaină şi purificate prin cromatografie prin schimb anionic . Cristalele – complex canal – fragment Fab au permis determinarea elegantă a structurii. Fazele au fost determinate prin înlocuirea moleculară folosind o structură cunoscută a altui fragment Fab, plierea imunoglobulinei păstrându-se foarte bine. În plus, fragmentul Fab de aproximativ 54 kDa reprezintă cea mai mare componentă a complexului, comparativ cu subunitatea canal de aproximativ 11kDa. Cristalele complexului au prezentat o difracție substanțial îmbunătățită (sub 2Å) față de precedentele forme ale cristalelor canalelor K^+ KcsA (rezoluție 3,2Å). Fragmentul Fab formează legături la nivelul suprafeței extracelulare a subunității canalului. Toate contactele de legătură din cristal se formează între fragmentele Fab, lăsând un spațiu central relativ mare pentru molecula canalului cu miceliul – detergent, decilmaltozida. Dimensiunea unui fragment Fab pare a fi foarte potrivită pentru cristalizarea canalelor şi altor proteine membranare ale căror domenii ce ies în afara bistratului lipidic nu au o dimensiune prea mare.

11.2.2. Generarea anticorpilor adecvați pentru co-cristalizare

Până în prezent, fragmentele de anticorpi folosite cu succes în co-cristalizarea proteinelor membranare erau derivate din anticorpii monoclonali obținuți prin clasica tehnologie a hibridomului. Pentru a se realiza stabilitatea complexului necesară pentru cristalizare, anticorpii parentali precum şi derivații acestora trebuie: (1) să lege antigenul în conformația nativă a acestuia, (2) să aibă o afinitate de legare mare pentru a permite formarea complexelor stoichiomerice stabile şi (3) să formeze un complex rigid cu antigenul lor nativ. Sunt de preferat anticorpi cu afinitate de legare pentru un epitop discontinuu şi nu unul linear. Adesea, într-un răspuns imun sunt recunoscute ca epitopi capetele N- şi C- terminale ale polipeptidelor precum şi

buclele expuse. Totuşi, deseori aceste peptide sunt flexibile, iar legarea unei molecule de anticorp va introduce foarte probabil un domeniu mobil ce va fi nefavorabil cristalizării. Specificitatea pentru un epitop discontinuu poate fi uşor verificată prin Western imunoblot după separarea proteinei denaturate prin SDS-PAGE, în care anticorpul nu ar trebui să se lege de polipeptidul linear.

11.2.2.1. Imunizarea

Una din primele etape importante pentru obținerea cu succes a unor anumite clone de hibridom este imunizarea animalelor cu antigen şi obținerea unui titru suficient de anticorp. Proteinele membranare solubilizate prin detergent şi purificate au fost utilizate cu succes ca şi antigene pentru obținerea liganzilor de înaltă afinitate pentru membranare native, ca de exemplu pentru obținerea anticorpului monoclonal 18E11 specific QCR din drojdie sau diverşi anticorpi monoclonali specifici pentru proteina schimbătoare de ioni Na^+/H^+ (sistem antiport) NhaA.

În general, protocoalele de imunizare pe termen lung sunt folositoare pentru obținerea multor liganzi de înaltă afinitate. Într-un protocol standard aplicat pentru obținerea anticorpilor îndreptați împotriva QCR din drojdie şi NhaA, şoareci BALB/c femele în vârstă de 10 săptămâni au fost imunizați prin injecții intraperitoneale cu proteină înalt purificată, solubilizată în detergent [100µg proteină în 50% (v/v) adjuvant (ABM2; Pan Biotech, Aidenbach, Germany) într-un volum total de 250µl]. Imunizarea inițială a fost urmată de 4 injecții cu suspensie proteică la interval de 4 săptămâni[50µg proteină în 50% (v/v) adjuvant (ABM1; Pan Biotech) într-un volum total de 250µl]. Pentru administrarea finală, ultima injecție a fost repetată trei zile consecutiv iar în ziua următoare şoareci au fost sacrificați pentru recoltarea splinei. S-a recoltat plasmă sanguină de la şoareci înaintea imunizării şi la 10 zile după fiecare injecție. După a treia imunizare, s-au obținut semnale clar pozitive până la o diluție a serului de 10^5 într-un test standard ELISA, folosind NhaA purificat drept antigen.

Evident, un asemenea regim de imunizare la mamifere mici pentru proteine membranare înalt omologe (derivate umane, de murine, de şobolan, de maimuțe) este mai puțin probabil să aibă ca rezultat producerea anticorpilor datorită mecanismelor

de self-toleranță. Totuşi, există câteva modalități de stimulare a răspunsului imun cum ar fi imunizarea genetică sau simpla utilizare a adjuvanților pe bază de nanoparticule lipidice îmbunătățite.

11.2.2.2. Selecția anticorpilor

Anticorpii corespunzători co-cristalizării proteinelor membranare trebuie să recunoască antigenul respectiv ca pe un complex. Totuşi, se impun anumite cerințe pentru selecția anticorpilor monoclonali de conformație specifică. Tipul şi concentrația detergentului este foarte importantă pentru menținerea proteinei în conformația sa nativă. Unii detergenți pot preveni legarea proteinelor de suprafețele de plastic şi polistiren folosite în mod curent ca suporturi pentru testul ELISA. În plus, adsorbția pe faza solidă poate determina denaturarea parțială a proteinei. Când s-a realizat obținerea anticorpilor monoclonali împotriva QCR din drojdie, s-au obținut 35 de clone ce recunosc proteina denaturată în Western-blot şi a fost selectată numai o clonă ce recunoaşte specific proteina nativă . Pentru aceasta s-a aplicat un test ELISA standard în care complexul solubilizat în detergent a fost ataşat matricei de polistiren. Pentru îmbunătățirea randamentului liganzilor nativi pentru proteinele membranare a fost concepută o strategie uşoară şi sigură, aşa numita his-tag ELISA, pentru imobilizarea corespunzătoare şi prezentarea antigenului „nativ” reprezentat de proteinele membranare recombinate his-tagged (cu o secvență terminală ataşată poli-histidinică), demnstrată pentru sistemul antiport NhaA. Proteina este imobilizată pe plăci ELISA acoperite cu Ni^{2+}-NTA în aceleaşi condiții tampon ca şi pentru purificarea antiportului prin cromatografie de afinitate metalică. În aceste condiții, în prezența detergentului duodecil-β-D-maltopiranozidă, proteina este pliată corespunzător şi complet funcțională şi se poate face acum trierea anticorpilor pe baza acesteia. Pornind de la peste 2000 de clone hibridom, s-au putut izola prin his-tag ELISA 6 anticorpi monoclonali tip IgG. Toți aceşti anticorpi obținuți sunt sensibili conformațional şi leagă antiportul solubilizat în detergent precum şi forma sa membranară. Doar unul din aceştia este pozitiv în Western-blot după separarea SDS-PAGE a proteinei. Acest anticorp (1F6) se leagă la un epitop linear expus la

suprafață localizat la nivelul capătului N-terminal al enzimei. Interesant, anticorpul monoclonal 1F6 leagă NhaA într-un mod dependent de pH ce reflectă dependența de pH a activării proteinei şi modificările conformaționale asociate demonstrate prin digestia cu tripsină. Acest anticorp poate fi folosit pentru purificarea de imunoafinitate a transportorului din extracte membranare neprelucrate prin legarea NhaA de anticorpul monoclonal 1F6 imobilizat şi eluția acestuia specifică printr-un schimb de pH. His-tag ELISA este o metodă importantă ce combină sensibilitatea, specificitatea şi raportul crescut semnal/zgomot al unui test de imunoadsorbție cu chimia proteinelor recombinate. Poate fi adaptată uşor la toate proteinele recombinate purificate cu ajutorul unui his-tag. Din cunoştințele noastre este primul exemplu de selecție a anticorpilor împotriva epitopilor conformaționali folosind o proteină membranară solubilizată prin detergent, respectiv cea mai comună formă de creştere a cristalelor 3-D tip II. Au fost raportate şi metode alternative de prezentare a proteinelor membranare în conformațiile lor native, cum ar fi selecția cu probe reconstituite prin lipide, fracțiuni membranare native îmbogățite sau celule intacte.

Etapa cheie a selecției anticorpilor adecvați din fuziuni hibridom sau bănci de anticorpi recombinați este reprezentată de screening-ul țintit. Cercetările adaptate specific permit selecția anticorpilor specifici pentru conformația proteică definită. Anticorpii selectați corect pot ajuta la captarea unei proteine flexibile într-o conformație fixă. Co-cristalizarea cu fragmente de anticorpi a facilitat determinarea structurii domeniului flexibil gp120.

11.2.2.3 Fragmentele de anticorpi

Anticorpii nativi nu sunt corespunzători co-cristalizării. Aceştia sunt flexibili în regiunea de legătură dintre domeniile variabile şi cele constante, iar modul de legare bivalent este în cele mai multe cazuri indezirabil. Fragmentele de anticorpi monovalente pot fi obținute prin clivajul proteolitic al întregului anticorp rezultând două fragmente Fab pentru fiecare moleculă de anticorp. Obținerea unei cantități suficiente de material de start pentru anticorpul monoclonal este realizată fie prin producerea ascitei fie prin culturi celulare cu linii celulare de hibridom de murine.

Apoi anticorpii monoclonali sunt purificați prin cromatografie de afinitate cu Proteina A. În etapa următoare, fragmentele Fab sunt obținute în mod obişnuit prin proteoliza cu papaină care clivează specific în regiunea mobilă/balama. Fragmentele Fab pot fi purificate prin depleția proteinei A a domeniului de clivaj constant al anticorpului, urmată de excluderea dimensională sau cromatografia schimbătoare de ioni. Fragmentele Fab sunt relativ uşor de obținut prin proteoliză, dar trebuie acordată atenție pentru producerea omogenă a fragmentelor, adecvate cristalizării. Părți reziduale ale ligandului flexibil şi în unele cazuri glicozilarea pot împiedica cristalizarea. În ciuda acestor probleme, au fost cristalizate un număr mare din acele fragmente Fab singure sau în complexe cu haptena respectivă sau cu antigenul respectiv, inclusiv cu o proteină membranară (canalul potasic KcsA).

Pe viitor, o alternativă promițătoare la obținerea anticorpilor monoclonali de la şoareci va fi adaptarea tehnologiilor phage-display sau ribosome-display la selecția *in vitro* a liganzilor pentru proteinele membranare. Până acum, sunt rare exemplele de selecție reuşită a anticorpilor specifici pentru proteinele membranare prin intermediul phage-display a băncilor non-imune. Anticipăm faptul că alte strategii vor fi probabil mai adecvate pentru stabilirea screening-ului anticorpilor acestor ținte prin phage-display, şi anume: (1) punerea în uz a unor bănci de anticorpi mult mai diverse (peste 10^{10} componente diferite), (2) utilizarea unui helper fagic ce permite prezentarea multivalentă a anticorpilor şi (3) screening-ul liganzilor după o singură etapă de bio-panning urmată de maturarea de afinitate *in vitro*.

Clonarea fragmentelor de anticorpi. Cel mai mic domeniu de legare pentru antigen a unui anticorp, respectiv fragmentul Fv, este constituit din domeniul variabil al lanțului greu şi a celui uşor, V_H, respectiv V_L. Fragmentele Fv nu pot fi obținute prin proteoliză, necesitând recombinarea pentru producerea lor. Pentru acest scop, genele ce codifică V_H şi V_L trebuie să fie clonate şi exprimate pornind de la linii celulare de hibridom. Aici este descrisă clonarea fragmentelor Fv prin reacția de polimerizare în lanț revers-transcriptaza (RT-PCR) (fig. 11.3). ARNm sau ARN total este izolat din linii celulare de hibridom de murine ce produc anticorpul de interes. În etapa următoare, sinteza ADNc poate fi efectuată simplu prin utilizarea oligo(dT) ca

şi primer. Pentru a amplifica genele V_H şi V_L, sunt folosiţi primeri degeneraţi care se potrivesc capătului terminal 5' al cadrului 1 şi capătului 3' al cadrului 4, corespunzător capetelor N-terminale ale lanţului greu şi uşor ale moleculei de anticorp, respectiv capetelor C-terminale ale domeniilor variabile. Secvenţa regiunilor cadru este foarte bine conservată, fiind elaborat un set de perechi de primeri pentru amplificarea specifică a genelor ce codifică lanţul V_λ, subclasele 1, 2, 3 şi 5 ale lanţului V_k, subclasele 4 şi 6 ale lanţului V_k, şi V_H. Aceşti primeri conţin situsuri de restricţie unice, care permit inserţia produsului PCR în plasmida pASK68 care este utilizată pentru producerea fragmentului Fv în periplasma *E. coli* (a se vedea mai jos).

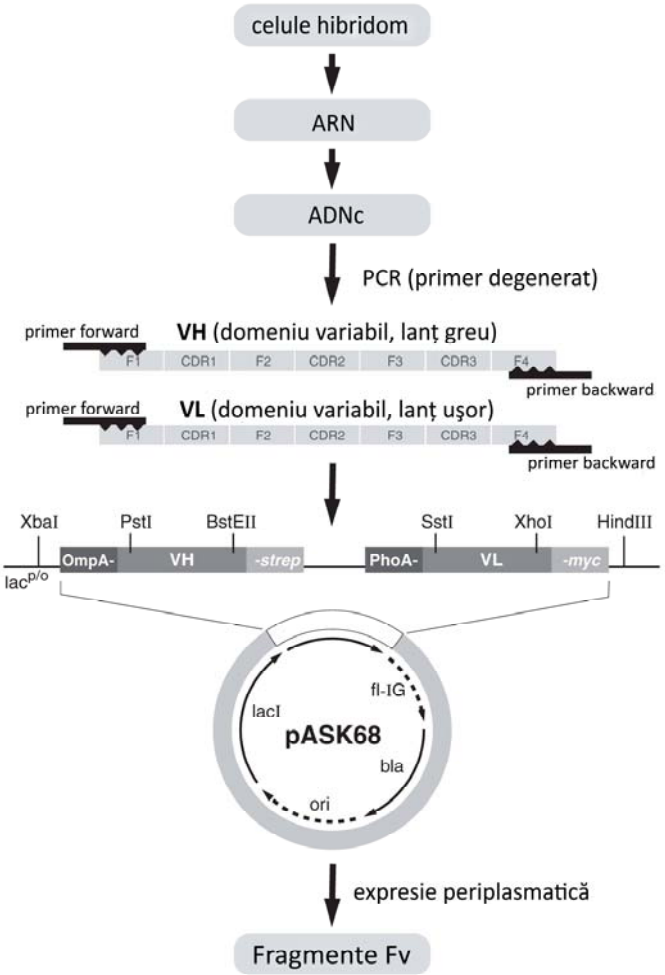


Fig. 11.3. **Reprezentare schematică a strategiei pentru clonarea şi expresia fragmentelor Fv din linii celulare hibridom monoclonale prin RT-PCR**. Genele care codifică pentru domeniile variabile ale lanţurilor grele şi uşoare (V_H şi respectiv V_L) sunt inserate în plasmida bicistronică pASK68 pentru expresie periplasmatică în *E. coli*. Secvenţele semnal OmpA şi PhoA sunt utilizate pentru ţintirea polipeptidelor la periplasmă. Pentru purificare este ataşat un strep-tag la lanţul greu; fuziunea myc-tag permite detecţia lanţului uşor cu anticorpul monoclonal 9E10.

Digestia H RN-azei antisens-direcționată poate fi utilizată pentru inhibarea amplificării produşilor de transcripție ARNm nefuncționali introduşi în liniile celulare de hibridom în cursul fuziunii cu linia celulară de mielom nonsecretoare.

Această abordare rapidă şi robustă a fost folosită pentru clonarea câtorva fragmente de anticorpi, inclusiv fragmentele Fv ale anticorpului monoclonal 7E2 specific pentru COX a *P. denitrificans*, anticorpul monoclonal 18E11 specific pentru QCR din drojdie şi anticorpii monoclonali 2C5 şi 5H4 specifici pentru antiporter-ul (proteina transportoare împotriva gradientului) NhaA din *E. coli*. Totuşi, în unele cazuri prin această metodă nu s-a reuşit amplificarea genelor dorite. Din acest motiv, a fost conceput un nou set de primeri care ia în considerare secvențele diferite ale subgrupelor, aşa cum sunt listate în banca de date Kabat (fig. 11.4).

Pentru fiecare subgrup de anticorpi a fost realizat un anumit forward primer. Poziția backward-ului primer a fost modificată în aval către regiunea constantă cea mai bine conservată. Mai mult, situsurile de restricție au fost omise pentru o mai bună acuratețe. Produşii PCR au fost apoi clonați fie prin legarea TA, fie la capetele terminale ale vectorilor de secvențiere. După confirmarea secvenței anticorpului, s-au introdus prin PCR situsuri de restricție pentru potrivirea la vectorul de expresie dorit.

O strategie similară, bazată pe primeri degenerați, poate fi utilizată pentru clonarea fragmentelor Fab. Mai mult, pot fi produse fragmente Fab hibride prin inserția genelor V_H şi V_L într-un vector care conține deja domenii constante ale unei molecule de anticorp.

Au fost publicate şi strategii alternative bazate pe PCR şi seturi de primeri, incluzând clonarea prin amplificarea rapidă a capetelor terminale ale ADNc (RACE). Adesea, sunt legate covalent lanțuri grele şi uşoare prin interpunerea unui peptid de legătură, generând aşa numitele fragmente Fv sc (single-chain, lanț unic) sau prin conectarea lanțurilor prin intermediul unei punți disulfidice (fragmente dsFv).

Deşi aceste măsuri sunt menite să stabilizeze fragmentele recombinate, în anumite cazuri pot afecta în mod negativ proprietățile de legare ale fragmentului. Fragmentele Fv7E2 şi Fv18E11, care au fost utilizate la cristalizarea COX şi QCR nu conțin un ligand sau o punte disulfidică adițională (vezi fig. 11.4).

A. Set primer I .

regiunea FR1 a lanțului ușor K I, II, III, V (SstI)

VKC1T	GAC	GAC	*GAG*	*CTC*	AC**M**	CAG	**W**CT	CCA	**KY**C	TCC	CTG
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

regiunea FR1 a lanțului ușor K IV, VI (SstI)

VKC1T	GAC	GAC	*GAG*	*CTC*	ACC	CAG	TCT	CCA	CGA	ATC	ATG
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

regiunea FR4 a lanțului ușor K (XhoI)

VKR1T	CCG	TTT	CAG	*CTC*	*GAG*	CTT	GGT	**S**CC	**WS**C	**W**CC	GAA	CGT
	108	107	106	105	104	103	102	101	100	99	98	97

regiunea FR1 a lanțului greu (PstI)

VHC1T	GAG	GT**K**	**MAG**	*CTG*	*CAG*	**S**AG	TC**W**	GGG	**S**CT	GGS	YTG
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

regiunea FR4 a lanțului greu (BstEII)

VHR1T	TGA	GGA	GAC	GGT	GAC	CGT	GGT	CCC	TTG	GCC	CCA
	113	112	111	110	109	108	107	106	105	104	103

simbol	**semnificație**	**simbol**	**semnificație**
A	Adenină	Y	pYrimidină (C sau T)
C	Citozină	M	A sau C
G	Guanină	W	A sau T
T	Timină	S	C sau G
R	puRină (A sau G)	K	G sau T

(simbolurile de o singură literă ale nucleotidelor sunt conforme cu nomenclatura IUB)

Fig.11.4 (A). Seturile de primeri folosiți pentru amplificarea genelor ce codifică V_H și V_L ale anticorpilor monoclonali murini. (A). Primerii degenerați cu situsuri de restricție unice au fost elaborați pentru clonarea genelor compatibile pentru inserția în plasmida pASK68 folosită pentru expresia periplasmatică în *E. coli*.

Fig.11.4 (B) Amplificarea genelor V_H şi V_L este îmbunătățită considerabil folosind setul primer specific de subgrup. Folosind acelaşi model ADNc, fiecare combinație de primeri este testată în paralel la diferite temperaturi în majoritatea cazurilor gena corectă este amplificată printr-o anumită combinație primer.

C. secvențele de aminoacizi ale subtipurilor de anticorpi murini complementari seturilor de primeri

VL-κ	1	2	3	4	5	6	7	8	9
VK-I	D	I	V	M	T,S	Q	S	P	S
VK-II1	D	V	V,L	M,L	T	Q	T	P	
VK-II2	D	I	V	M	T	Q	A	A	
VK-II3	D	I	V	I,M	T	Q	D	E	L
VK-III	K,D	I	V	L	T	Q	S	P	
VK-IV	Q,E	I,N	V	L	T	Q	S	P	A,T
VK-V1	D	I	Q	M	T	Q	T,S	T,P	S
VK-V2	D	I	V,Q	M	T	Q	S	P	
VK-V3	D	I	V	M	T	Q	S	H	
VK-VI1	Q	I	V	L	T	Q	S	P	A
VK-VI2	E	N	V	L	T	Q	S	P	

116	115	114	113	112	111	110	109	VL-κ
S	V	T	P	A	A	D	S	VK-RT

VH	1	2	3	4	5	6	7	8	9
VH-IA	E,D	V	Q	L	Q	E	S	G	
VH-IB	Q	V	Q	L	K	E,Q	S	G	
VH-IIA	E,Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	
VH-IIB	Q	V	Q	L	Q	Q	P,S	S	
VH-IIC	E	V	Q	L	Q	Q	S	S	
VH-IIIA	E	V	K	L	V	E	S	G	
VH-IIIB	E	V	K	L	L	E	S	G	
VH-IIIC	E	V	K	L	D	E	T	G	
VH-IIID	,D	V	Q,K,M	L	V	E	S	G	
VH-VA	E,Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	

137	136	135	134	133	130	129	128	VH
M	S	N	T	Q	A	A		VH-G1A
M	S	N	T	Q	A	A		VH-G1B
M	S	N	T	Q	A			VH-G1C
S	S	G	T	T	D	G	C	VH-G2a/b

simbol	semnificație		simbol	semnificație	
A	Alan	ină	M	Met	ionină
G	Glic	ină	S	Ser	ină
L	Leuc	ină	V	Val	ină
P	Prol	ină	D	Asp	artic acid
T	Tre	onină	N	Asp	aragină
C	Cist	eină	E	Glu	tamic acid
H	Hist	idină	Q	Glu	tamină
I	Izol	eucină	R	Liz	ină

Fig.11.4. (C) Secvențele corespunzătoare de aminoacizi ale anticorpilor de diferite subgrupuri pentru partea complementară a setului primer II. Resturile V_H şi V_L sunt numerotate în conformitate cu Kabat şi colab.(1991).

Producerea fragmentelor de anticorpi. Pentru producerea fragmentelor de anticorpi recombinați, cum ar fi pentru *E. coli*, *Pichia pastoris* sau celule de la mamifere, s-a folosit o varietate de sisteme de expresie. Genele ce codifică domeniile variabile ale lanțurilor uşoare şi grele sunt inserate în operonul digistronic al plasminei pASK68 permițând expresia periplasmatică în E. coli sub controlul promotorului inductibil *lac*. Fuziunea N-terminală a secvențelor semnal OmpA şi PhoA facilitează secreția lanțurilor grele şi uşoare la nivelul periplasmei. O peptidă-ligand a streptavidinei (strep-tag) este ataşată la nivelul capătului C-terminal al domeniului V_H pentru purificare prin cromatografie de afinitate cu streptavidină, iar un myc-tag (recunoscut de anticorpul monoclonal 9E10) este prezent la nivelul capătului C-terminal al domeniului V_L fiind folosit pentru detecția fragmentului de anticorp prin Western-blot sau Elisa.

Când se produce expresia unui fragment de anticorp care se leagă de o proteină membranară ce îşi are sediul în mod normal la nivelul membranei citoplasmatice a gazdei, noi va trebui să luăm în considerare faptul că anticorpul inhibă activitatea proteinei şi astfel creşterea celulei. În cazul sistemului antiport NhaA, chiar dacă majoritatea anticorpilor au avut un efect inhibitor asupra activității acestuia, expresia periplasmatică a fragmentelor Fv şi Fab a fost posibilă deoarece transportorul are importanță vitală doar în anumite condiții de creştere, cum sunt concentrațiile mari de sodiu sau litiu, sau pH în prezența sodiului. În plus, epitopii respectivi ar putea fi expuşi pe suprafața extracelulară sau să nu fie accesibili.

În sisteme de expresie bacteriene, fragmentele Fv şi Fab sunt produse în mod normal în spațiul periplasmatic, unde mediul oxidativ permite formarea legăturilor disulfidice esențiale pentru plierea adecvată şi activitatea anticorpilor. Producția proteică variază pentru diferite fragmente de anticorp cu producții de 1,5mg de proteină/l de cultură bacteriană în cazul fragmentelor Fv stabile. Fragmentele Fab sunt exprimate în cantități şi mai mici (0,1-0,4mg/l de cultură), mai probabil datorită complexității mai mari a legăturilor disulfidice şi masei mai mari. Producția lor reprezintă o problemă delicată în experimentele de co-cristalizare. Producția fragmentului Fab proteolitic este un proces care implică multe etape, necesită mult timp şi este costisitor. Adesea producția de proteină pură este sub 30% din proba de proteină inițială.

Fragmentele Fab au fost produse ca proteine chimerice cu domeniile constante C_H1 şi C_L ale altui anticorp, şi anume anticorpului monoclonal D1.3 specific lizozimului, prin subclonarea domeniilor V_H şi V_L a 3 anticorpi diferiți în vectorul pASK85-D1.3. Această plasmidă conferă un his-tag la nivelul capătului C-terminal al lanțului greu pentru purificare prin intermediul cromatografiei de afinitate metalică prin imobilizare. Acesta este destinat expresiei periplasmatice în *E. coli* sub controlul sistemului represor/promotor tetraciclinic. Fragmentele de anticorp pentru anticorpul monoclonal 2C5 au rată de producție bună de 1,5 şi 0,5mg/l pentru Fv respectiv Fab. Fragmentele de anticorp ale 5H4 sunt produse la niveluri mult mai mici (0,1 şi 0,03 pentru fragmentele Fv respectiv Fab).

Înlocuirea resturilor încărcate şi voluminoase ale capătului N-terminal al domeniului variabil al lanțului uşor a îmbunătățit proprietățile de pliere şi solubilizare ale ultimilor anticorpi.

Producția poate fi considerabil crescută prin expresia aceloraşi fragmente hibride într-o citoplasmă bacteriană oxidativă folosind tulpina FA113 *E. coli* şi nou structuratul vector de expresie pFAB1. Aceasta a dus la producții sporite de 10-30mg fragmente Fab pure, funcționale pe litru de cultură E. coli, ceea ce reprezintă o cantitate adecvată pentru studii calitative de cristalizare.

În plus, fragmentele scFv derivate din băncile phage-display au fost recent exprimate cu succes într-o tulpină similară co-exprimând chaperone moleculare.

11.2.3. Purificarea şi cristalizarea proteinelor

Pornind de la o sursă bună de proteine naturală sau recombinantă, purificarea trebuie să asigure preparate proteice pure şi omogene în cantități suficiente. În general metodele de purificare ale proteinelor membranare sunt aceleaşi cu cele aplicate pentru proteine solubile cu excepția faptului că proteinele membranare integrale sunt purificate ca şi complexe proteină-detergent.

Proteinele membranare sunt menținute solubile în soluții detergent micelare la o concentrație de lucru pentru detergent de 1,5 până la 2 ori CMC. Alegerea detergentului pentru solubilizare şi purificare este importantă. Majoritatea materialelor de purificare tolerează o gamă largă de detergenți. Sistemele de purificare prin afinitate au avantajul vitezei de lucru crescute şi specificității mari în comparație cu procedeele cromatografice standard cum ar fi cromatografia de schimb anionic sau cromatografia prin excludere de dimensiuni.

Pentru anumite aplicații, ca de exemplu pentru cristalizare, fragmentele de anticorpi recombinați pot fi folosiți în cromatografia de imunoafinitate indirectă pentru purificarea într-o singură etapă a complexelor membranare proteină-anticorp aşa cum este menționat mai jos.

11.2.3.1. Purificarea prin imunoafinitate indirectă

Fragmentele de anticorp recombinat sunt instrumente adaptabile pentru analiza structurală a proteinelor. Ele pot fi folosite pentru prepararea complexelor proteice membranare, cu producție de materiale înalt purificate pentru cristalizare într-o singură etapă de cromatografie prin imunoafinitate.

În comparație cu metodele clasice cum ar fi cromatografia de schimb anionic sau cromatografia prin excludere de dimensiuni, cromatografia de imunoafinitate oferă un factor de purificare excelent – de obicei între 100 şi 10.000 – datorită înaltei specificități a interacțiunilor dintre antigen şi anticorp sau fragmentul de anticorp. Totuşi, datorită acestor interacțiuni puternice, de obicei sunt necesare protocoale de eluție intensă dacă anticorpii sau fragmentele acestora sunt cuplați covalent la matricele activate sau captați de Proteina A sau G imobilizată. Fragmentele de anticorpi prelucrați pot fi totuşi legați non-covalent şi reversibil la o matrice corespunzătoare prin intermediul tag-urilor (secvențelor terminale repetitive adăugate), cum ar fi strep-tag. Ulterior proteina este supusă eluției sub formă de co-complex cu fragmentul de anticorp (fig. 11.5) şi poate fi folosită ca atare pentru experimentele de cristalizare.

Această abordare prin cromatografia de imunoafinitate combină avantajele tehnicilor bazate pe interacțiunea antigen/anticorp şi afinitate, şi anume înalta specificitate şi protocoalele de purificare bine stabilite, rapide de largă aplicabilitate. Tehnica permite izolarea proteinei din sursa ei naturală precum şi din sistemele de expresie în forma sa nativă fără ataşarea markerilor de afinitate. Evident, proteina purificată este prezentă într-un complex cu fragmentul de anticorp legat, ce nu ar trebui să afecteze activitatea biologică a proteinei, excepție făcând cazurile când acest lucru este dorit.

COX din *P. denitrificans* precum şi produşii de oxidare quinolici din *P. denitrificans* şi *E. coli* au fost purificați eficient prin cromatografia de imunoafinitate indirectă într-o singură etapă folosind fragmente de anticorp recombinat fără afectarea proprietăților funcționale ale acestor complexe proteice membranare.

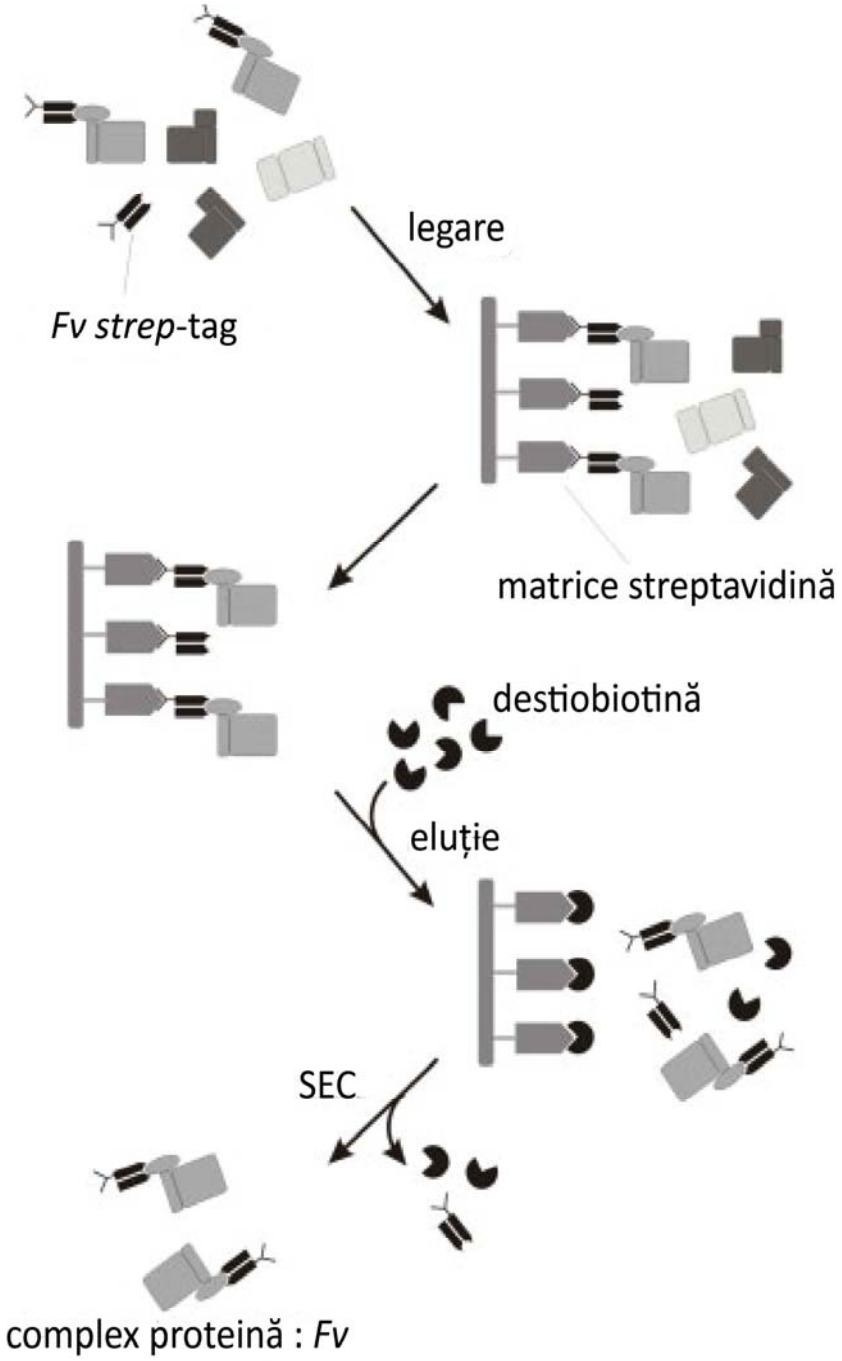


Fig.11.5 Reprezentarea schematică a purificării unei proteine membranare formată din mai multe subunități în complex cu un fragment de anticorp (fragment Fv strep-tag) prin cromatografie de imunoafinitate indirectă. Membranele celulare solubilizate sunt combinate cu extracte periplasmatice ale tulpinii de E. coli ce produce fragmentul Fv şi aşa-numitul complex este format. Amestecul este aplicat unei coloane de afinitate cu streptavidină, ca şi complexul, fragmentele Fv singure fiind de asemenea legate prin intermediul strep-tag. Acestea sunt specific eluate prin înlăturarea competitivă cu un ligand corespunzător după îndepărtarea tuturor celorlalte proteine într-o etapă de spălare. Fv în surplus poate fi separat prin cromatografie de excludere prin dimensiune, rezultând complexul pur al proteinei membranare şi fragmentului Fv.

În contrast, cromatografia de afinitate cu streptavidină nu poate fi utilizată pentru purificarea co-complexului QCR – fragment Fv. Un singur helix transmembranar ancorează subunitatea Rip1p de la periferia porțiunii transmembranare a complexului, iar „tragerea” de domeniul extrinsec prin intermediul fragmentului Fv determină dezintegrarea QCR până la un anumit punct. Din acest motiv, fragmentele Fv şi QCR au fost purificate separat iar complexele au fost formate ulterior prin fragmente Fv în surplus, îndepărtate apoi prin cromatografie de excludere prin dimensiune.

11.2.3.2. Cristalizarea

Cristalele proteice membranare sunt obținute prin tehnici şi condiții de cristalizare standard care sunt utilizate de rutină pentru proteine solubile, iar identificarea condițiilor de cristalizare optime nu pare a fi un impediment. Caracterizarea biochimică riguroasă a preparatelor proteice combinată cu cercetarea detergentului cel mai adecvat poate reprezenta cea mai eficientă strategie pentru a face față dificultăților cristalizării proteinelor membranare. Heterogenitatea proteică trebuie evitată; ea poate fi determinată de proteoliză, diversele condiții de reacție sau de modificări post-translaționale, cum ar fi glicozilarea. Cristalizarea canalului de apă AQP1a fost efectuată cu probe proteice complet deglicozilate. În general, cristalizarea poate fi limitată de terminațiile flexibile sau buclele şi clivajul proteolitic, iar produsele recombinate ce omit aceste terminații pot fi folositoare. De exemplu cristalizarea canalului de potasiu KcSA a fost obținută numai după clivajul proteolitic a 35 aminoacizi c-terminali.

Mai mult, mutageneza restrânsă la nivelul suprafeței polare a proteinelor membranare exterioare OmpA şi OmpX a fost folosită pentru optimizarea cristalizării. Aici ar trebui menționat un alt aspect important. Multe proteine membranare îşi modifică considerabil conformația în timpul activității biologice. Pentru reuşita cristalizării ar pute fi necesară fixarea anumitor domenii mobile, de exemplu prin utilizarea unor inhibitori specifici. Domeniul mobil extrinsec al subunității Rip1p a complexului de citocromi bc_1 nu a fost rezolvat în prima structură a complexului din

mitocondria bovină. Structura domeniului a fost vizibilă numai după imobilizarea acestuia prin contactele de legătură din cristal sau prin adiția inhibitorilor Q_o specifici de situs. Pot fi folosite diferite metode pentru îmbunătățirea stabilității unei proteine. Dacă nu pot fi identificate metode sau detergenți pentru menținerea proteinei stabile şi adecvate pentru cristalizare, este recomandabilă selecția mutantelor stabile. Fragmentele de anticorpi pot fixa o conformație proteică definită sau pot stabiliza un domeniu flexibil pentru susținerea încercărilor de cristalizare dacă au fost selectați anticorpi adecvați. Condițiile de cristalizare a proteinelor membranare în complex cu fragmente de anticorp cuprind diverse valori al pH-ului şi concentrației saline ce indică stabilitatea crescută a complexelor antigen-anticorp. Nu sunt disponibile date referitoare la constantele de legare reale ale exemplelor reuşite; totuşi, în toate cazurile fragmentele de anticorpi sunt folosite în exces molar în cursul purificării iar complexele stoichiometrice sunt obținute folosind filtrarea în gel ca etapă finală de purificare. Utilizarea complexelor antigen-anticorp stoichiometrice pentru cristalizare este un indicator clar al afinității înalte a anticorpilor.

11.2.3.3. Abordări alternative pentru expansiunea suprafeței polare

Dacă este disponibil un sistem de expresie recombinat, proteinele de adiție sau fuziune par a fi alternativa rapidă pentru creşterea suprafeței accesibile pentru solvent a proteinei membranare şi astfel a potențialului de cristalizare. Totuşi, fuziunile proteice sunt intermediate printr-o regiune de legare cu proteina de interes. Acest linker va permitea introducerea unui domeniu flexibil, un aspect nefavorabil cristalizării. Într-o încercare de a îmbunătății calitatea cristalului a citocromului ubiquinol oxidază bo_3 legat de membrană din *E. coli*, proteina a fost produsă ca şi fuziune C-terminală a proteinei Z la subunitatea IV. Proteina de fuziune a cristalizat în condiții similare cu complexul nativ dar cristalul a fost şi mai puțin ordonat.

Experimentele de înlocuire moleculară nu au fost reuşite iar proteina Z nu a putut fi plasată în model. Acest lucru se poate datora rezoluției scăzute a datelor de difracție (6Å) sau poate indica dezordinii ale proteinei Z. Strategia de fuziune pentru creşterea suprafeței hidrofile poate fi folositoare în general şi de asemenea poate fi

valoroasă pentru proiectele genomice structurale dacă partenerii de fuziune pot fi ataşați rigid. S-a încercat adăugarea partenerilor de fuziune nu la nivelul terminației protidice, ci între două porțiuni helicoidale transmembranare. Citocromul solubil b_{562} a fost inserat în una din buclele citoplasmatice ale lactoz-permeazei, o proteină transportoare secundară cu 12 helix-uri transmembranare. „Red-permeaza" (permeaza roşie) avea activitate de transport şi a permis obținerea de cristale 2-D, însă nu s-a raportat obținerea de cristale 3-D cu o bună difracție.

Alegerea partenerilor de reacție fiziologic stabili sau stabilizarea interacțiunilor proteină- proteină poate reprezenta o alternativă pentru creşterea domeniilor de expunere la solvent a proteinelor membranare pentru cristalizare.

11.3. Concluzii

În ultimii ani, cercetarea în domeniul structurii proteinelor membranare a evoluat rapid, deschizând calea descoperirilor raționale a medicamentelor. Totuşi, numărul structurilor proteice membranare la rezoluție aproape atomică este încă mic în comparație cu cel al proteinelor solubile. Fragmentele de anticorpi sunt utilizate pentru creşterea suprafețelor hidrofile a proteinelor membranare îmbunătățind astfel şansele cristalizării 3-D. Prin această metodă s-au obținut deja structuri de înaltă rezoluție pentru 3 proteine membranare diferite. Toate fragmentele de anticorp utilizate pentru co-cristalizarea cu succes a proteinelor membranare până în momentul de față au fost derivate din anticorpi monoclonali obținuți prin tehnologia clasică a hibridomului. Aceştia recunosc epitopii nativi, non-lineari a antigenelor respective şi se leagă cu înaltă afinitate. Pentru a conferi acestei strategii statutul de metodă cu caracter general în domeniul cristalizării proteinelor membranare, tehnicile de recombinare a anticorpilor trebuie optimizate pentru a permite accesul rapid la liganzii de înaltă afinitate. Cristalizarea mediată prin fragmente de anticorpi poate fi folositoare în mod deosebit pentru proteine membranare constituite în principal din helixuri transmembranare cu bucle expuse la solvent foarte scurte, precum şi pentru consolidarea proteinelor flexibile într-o conformație fixă.

PARTEA IV: ELEMENTE DE CINETICĂ, METABOLISM ŞI TOXICOLOGIE ALE MEDICAMENTELOR

CAPITOLUL 12

FARMACOGENETICA: EFECTUL VARIANTELOR GENETICE ÎN DISPONIBILITATEA ŞI RĂSPUNSUL MEDICAMENTELOR

12.1. Considerații generale

Este bine cunoscut faptul că în practica clinică există o variație interindividuală remarcabilă în ceea ce priveşte răspunsul biologic al pacienților la administrarea unui medicament. Această variabilitate poate fi rezultatul a numeroşi factori, cum ar fi patogeneza şi severitatea bolii tratate, bolile asociate, vârsta pacientului, funcționarea rinichilor şi a ficatului, starea de nutriție şi interacțiunile dintre medicamente. În ciuda relevanței acestor factori, variațiile comune ale genelor ce codifică enzime de metabolizare a medicamentelor (DMEs), transportatorii de medicamente şi receptorii medicamentelor țintă - aşa-numitele polimorfisme - contribuie în mod semnificativ la heterogenitatea răspunsului la medicamente observat în cadrul populației [Renegar , 2001].

Investigarea sistematică a influenței polimorfismului genetic în variabilitatea interindividuală a răspunsului biologic la medicamente este denumită "farmacogenetică". Mai detaliat, farmacogenetica se ocupă cu: detectarea diferențelor ereditare, moştenite în răspunsul la medicamente, evaluarea mecanismelor moleculare fundamentale de la nivel genetic şi la nivel de proteine, stabilirea de relații valabile între genotip şi fenotip, evaluarea relevanței clinice a răspunsului medicamentelor polimorfice, şi dezvoltarea de metode de testare pentru a identifica pacienții care ar putea prezenta un risc terapeutic crescut sau beneficiu terapeutic

scăzut datorită predispoziției lor genetice, înainte de începerea terapiei medicamentoase.

Prima observație în ceea ce privește diferențele moștenite în răspunsul la un produs chimic, a constituit-o incapacitatea de a simți gustul feniltioureei evidențiată încă din 1932 [Snyder, 1932]. Farmacogenetica își are începuturile în anii 1950, atunci când variațiile determinate genetic au fost considerate a fi cauza efectelor adverse ale medicamentelor. De exemplu, hemoliza după tratamentul antimalaric a fost corelată cu lipsa activității glucozo-6-fosfat dehidrogenazei eritrocitare. În mod similar, o deficiență în activitatea enzimei de acetilare N-acetiltransferaza 2 (NAT2) a fost considerată cauza neuropatiei periferice după izoniazidă.

Elucidarea bazelor geneticii moleculare a diferențelor moștenite în răspunsul la medicamente a început la începutul anilor 1980, cu clonarea și caracterizarea unei gene umane polimorfice ce codifică CYP2D6 (debrisoquin hidroxilaza DME citocrom P450 monooxigenaza II D6) [Gonzalez și colab., 1988]).

De atunci, au fost stabilite pentru un număr tot mai mare de gene umane relații între variantele alelice, modificările funcționale la nivel de proteină și rezultatul clinic (răspunsul la medicamente) .

12.2. Relații între genotip și fenotip

Efectul farmacologic global al unui medicament atunci când se administrează la un individ este rezultatul metabolismului medicamentului și disponibilității sale, interacțiunii medicament-țintă, care la nivel molecular sunt mediate de enzime [Evans, 1999; Weinshilboum, 2003]. Diferențele genetice pot induce modificări la nivel enzimatic prin diverse mecanisme moleculare:

- gena ce codifică enzima poate să fie absentă, determinând lipsa completă a enzimei;
- dacă mutațiile survin în regiunea de reglare a genei, poate să conducă la formarea de ARNm puțin și o cantitate redusă de enzimă;
- o mutație la granița intron-exon poate duce la splicing-ul incorect al pre-ARN și astfel, la formarea unei enzime incomplete sau inactive;

- o mutație în cadrul unui exon poate provoca schimbări nonsinonime şi nonconservative de aminoacizi în proteine, care au ca rezultat fie pierderea completă sau numai modificarea activității enzimatice, dacă schimbările de aminoacizi sunt importante pentru activitarea enzimei sau nu;
- în contrast cu situațiile care conduc la absența sau scăderea activității enzimatice, existența mai multor copii ale genei în cauză ar putea conduce la creşterea expresiei enzimei codificate.

În contrast cu aceste alterări genetice funcționale, există de asemenea modificări genetice silențioase. De exemplu, schimbările de nucleotide de la nivelul intronilor nu vor conduce la nici o variație observabilă a structurii/activității enzimatice (de fapt, majoritatea polimorfismelor genomice aparțin tipului silențios) .

În plus față de aceste mecanisme, la nivel macroscopic relația dintre variația genetică (genotipul) şi schimbările interindividuale măsurabile/observabile interindividual în răspunsul la medicamente în populație (fenotipul) depinde puternic de numărul de modificări genetice presupuse.

Dacă o singură variație genetică determină o trăsătură, fenotipurile vor urma un model de transmitere mendelian sau monogenic. În acest caz, în populația observată, rezultatul va fi o frecvență de distribuție bimodală. În special, în studiile familiale, diferitele fenotipuri vor fi clar separate unele de celelalte.

Metabolismul medicamentelor este adesea o trăsătură monogenică, unde concentrația plasmatică a medicamentelor depinde numai sau în principal de activitatea unei singure enzime de metabolizare [Evans, şi Johnson, 2001]. În acest caz, de obicei, cohortele celor două fenotipuri sunt împărțite în metabolizanți/metabolizatori lenți (PMs) şi metabolizanți/metabolizatori buni/normali (EMs) [Wormhoudt şi colab., 1999]. Un scenariu similar rezultă în cazul în care un polimorfism al unei singure gene determină diferențe în sensibilitatea receptorilor medicamentelor la un anumit medicament, discriminând fenotipurile responsive şi nonresponsive.

Pe de altă parte, în cazul în care o trăsătură este rezultatul mai multor variații genetice, atunci superpoziția efectelor moleculare diferențiale va conduce la o

frecvență de distribuție mai mult sau mai puțin unimodală, în care diferitele fenotipuri nu mai sunt clar separate unele față de altele. În general răspunsul la medicamente este poligenic, din cauza complexității cascadelor fiziologice implicate, care, eventual, sunt controlate de jocul combinat al unei varietăți de gene codificatoare de enzime.

12.3. Stabilirea relațiilor între genotip şi fenotip

Până de curând, relația dintre fenotip şi genotip a fost stabilită începând cu observațiile clinice a variațiilor interindividuale în răspunsul la medicamente. Analiza distribuției a condus la descoperirea fenotipurilor. În consecință, genele potențiale de bază şi variantele lor alelice au fost identificate prin clonare şi secvențiere, în timp ce ereditatea trăsăturilor a fost elucidată prin studii familiale şi ale gemenilor. Fiind bazate pe fenotipul clinic, aceste abordări de farmacogenetică clasică au permis, probabil, ca polimorfismele detectate să fie legate cauzal şi validate clinic. Cu toate acestea, deşi funcționează destul de bine pentru trăsăturile monogenice, abordările nu sunt capabile de a corelara genotipul cu fenotipul în cazul trăsăturilor poligenice.

Implementarea relațiilor dintre genotip-fenotip pentru trăsăturile poligenice necesită o strategie diferită şi mai largă, care realizează abordarea de bază a noii discipline- farmacogenetica. Abordarea farmacogenetică este bazată pe faptul că genomul uman conține polimorfisme numeroase, cum ar fi repetiții scurte în tandem şi polimorfime mononucleotidice (SNPs), care ar putea sau nu ar putea să determine modificări funcționale la nivel de proteină, ce ar fi în dezechilibru de linkage cu alelele funcționale [Nowotny, 2001; Brookes , 1999]. În consecință, aceste polimorfisme comune pot acționa ca markeri pentru alelele funcționale.

Scanarea unei regiuni ADN pentru aceste polimorfisme produce o hartă a markerilor, care sunt apoi testați pentru asocierea cu fenotipul în cauză. Este posibil să se identifice asociații între markerii genetici şi răspunsurile individuale la medicamente care pot fi sau nu de cauzalitate, fără a necesita cunoştințe de biochimie a funcției genei implicate. Bazată pe genotip, această abordare poate fi aplicată pentru orice trăsătură, independent de faptul că este monogenică sau poligenică. Scopul final

este acela de a crea hărți de biomarkeri la nivel genomic, care ar putea fi corelate cu anumite fenotipuri pe baza studiilor de asociere nonfamiliale.

În scopul realizării de cartografieri ale polimorfismelor cu densitate înaltă, SNPs par a fi polimorfismele de alegere. În comparație cu alte tipuri de variante genetice, cum ar fi variații ale numărului de repetiții în tandem (VNTRs), SNPs oferă o serie de avantaje. SNPs sunt cele mai frecvente forme de polimorfism ale genomului uman, care se produc, în medie, la fiecare 1000-2000 de perechi de baze, ce prezintă prin urmare o densitate de polimorfisme maximă. Ele sunt binare, ceea ce le face, bine adaptate pentru a fi automatizate şi pentru analize de mare capacitate. În cele din urmă, SNPs par să aibă rate de mutații reduse, şi, astfel, sunt relativ stabile în timp.

O varietate de tehnologii pot fi utilizate pentru identificarea şi caracterizarea polimorfismelor [Shi, 2001]. Acestea includ:

- polimorfismul conformațional monocatenar (SSCP);
- electroforeze în gel sensibile conformațional;
- detecția clivării nepotrivirii/ împerecherii greşite enzimatice sau chimice;
- electroforeza în gradient de gel denaturant ;
- analiza heteroduplexurilor prin denaturarea cromatografică în fază lichidă de înaltă performanță (HPLC) ;
- secvențierea ADN de mare capacitate;
- spectrometrie de masă (MS);
- scanarea şi resecvențierea pe membrane de nucleotide (scaning array).

Crearea hărților SNP ale întregului genom a devenit acum fezabilă odată cu progresele uriaşe făcute în analiza de mare capacitate a genelor.

În 2001, Grupul de Realizare a Hărților SNP a publicat o hartă de variație a secvențelor genomului uman conținând 1,42 milioane SNPs [International SNP Map Working Group., 2001]. Depozitul de date SNP ale consorțiului conține în prezent aproape 1,8 milioane SNPs (disponibil prin intermediul websitul-ui TSC Centrul Coordonator de Date la http://snp.cshl.org [Thorisson GA, 2003]).

În ciuda acestui progres semnificativ în cartografierea SNP, încercările de a stabili asociații între fenotipurile poligenice şi harta polimorfismelor genomului încă nu au reuşit. O întrebare esențială, în acest context, este câți markeri polimorfici trebuie să fie incluşi într-un studiu de asociere la nivel de genom. În principiu, numărul de polimorfisme pentru a fi evaluate într-un studiu este determinat de extinderea dezechilibrului de linkage.

Cu toate acestea, dezechilibrul de linkage prezintă o variabilitate genomică marcată, care este cauzată de o varietate de factori cum ar fi distanța între polimorfisme, rata de recombinare, vârsta polimorfismelor, istoricul populației, procesele de selecție şi abatere genetică. În consecință, încercări de a estima numărul minim de SNPs pentru a fi incluse în studii de asociere cu acoperire genomică au produs rezultate discutabile.

Simulări recente utilizând un model simplificat în populația generală sugerează că nivelurile dezechilibrului de linkage, nu depăşesc de obicei o distanță medie de 3 kb (1 kb = 1000 de baze perechi) în cadrul populației generale, ceea ce implică faptul că pentru studii asupra întregului genom, ar fi necesare aproximativ 0,5 milioane de SNPs [Kruglyak, 1999]. Datele experimentale au produs dezechilibre de linkage foarte variate, mărimea blocurilor estimate variază de la 5 la câteva sute de kilobaze (kb), cu diferențe în ceea ce priveşte dezechilibrul de linkage extins, care este adesea dependent de etnia şi/sau rasa populației examinate [Reich şi colab., 2001 ; Abecasis , 2001]. În ceea ce priveşte fezabilitatea, mărimea blocurilor cu dezechilibru de linkage poate fi avantajoasă.

De exemplu, un dezechilibru de linkage extins la 60 kb ar permite studii la nivelul genomului cu doar 30000 SNPs [Collins, 1999]. Cu toate acestea, chiar şi în acest caz, numărul de polimorfisme ce urmează a fi luate în considerare depăşeşte capacitățile tehnologice actuale. În plus, chiar şi după ce asocierea între genotip şi fenotip a fost demonstrată, mecanismele care stau la baza acestor asociații ar avea nevoie de studii suplimentare. În consecință, stabilirea relațiilor genotip-fenotip pe baza studiilor de asociere la nivel de genom pare a fi deosebit de importantă în viitor.

În acelaşi timp, aplicarea abordărilor farmacogenetice într-o manieră mai concentrată pentru una sau mai multe „gene candidate“, care sunt suspectate de a contribui la fenotipul în cauză, pare a fi cea mai indicată. Câteva exemple de succes de abordare a genei candidate, sunt cunoscute în literatura de specialitate, demonstrând corelațiile între polimorfismele țintei medicamentului în a modifica răspunsul la medicamente *(vide infra)*. În unele cazuri SNPs unice au oferit suficiente asociații cu răspunsul medicamentelor, în timp ce în altele corelația dintre trăsături cu haplotipul complet a dat rezultate mai bune.

12.4. Fenotiparea versus genotipare şi predicția răspunsului individual la medicamente

Odată ce un polimorfism este cunoscut, şi relația dintre variantele genetice şi fenotip a fost validată, este posibil să se prezică răspunsul la medicamente fie prin fenotiparea, fie prin genotiparea subiecților [Lockhart şi colab., 2000; Cronin, 2001]. În general, fenotiparea poate fi efectuată prin măsurarea directă a proprietăților oricărui biomarker specific unui sistem, organ sau țesut, de exemplu, activitatea enzimatică şi interacțiunile medicament-receptor. Abordarea generală include probe de îndepărtare şi determinare a activității biomarkerului prin teste biochimice relevante. Acest tip de fenotipare se numeşte fenotipare funcțională [Shi şi colab., 2001]. Deşi fenotiparea funcțională permite un test direct al nivelului de proteine sau enzime, există limitări în cazul în care activitățile enzimatice se suprapun peste substraturi specifice, de exemplu, în cazul de DMEs. Un alt dezavantaj al fenotipării funcționale este că necesită adesea metode invazive de prelevare a probelor, de exemplu, biopsie hepatică.

În cazul DMEs, fenotiparea funcțională poate fi înlocuită de fenotiparea metabolică. Fenotiparea metabolică necesită aplicarea unui medicament sondă, care este cunoscut a fi metabolizat de enzima în cauză, urmată de determinarea medicamentului nemodificat versus metaboliții lui în plasmă sau urină.

În mod ideal, o procedură de fenotipare ar trebui să fie uşor de a efectuat şi ieftină. Medicamentul sondă aplicat ar trebui să fie specific pentru enzima polimorfică în cauză, cu model metabolic cunoscut, uşor de testat şi în condiții de siguranță. Metoda de analiză ar trebui să fie sensibilă şi simplă.

Metodele de fenotipare au fost utilizate înainte ca instrumentele de biologie moleculară să devină disponibile şi acum ele au fost pe deplin validate. Avantajul fenotipării este acela că rezultatul reflectă în mod real activitatea metabolică individuală. Cu toate acestea, chiar şi în cazul metodelor optimizate, fenotiparea este susceptibilă de a identifica greşit factori, cum ar fi comedicația, nutriția sau boala. În plus, aceasta necesită un efort/timp semnificativ pentru obținerea de rezultate şi presupune o încărcătură suplimentară de medicamente asupra subiectului testat.

În contrast cu fenotiparea, genotiparea nu se adresează activității enzimatice reale, dar anticipează răspunsul individual la medicamente pe baza polimorfismelor genetice identificate [Zuhlsdorf , 1998].

Din punct de vedere tehnic, este relativ uşor a efectua genotiparea cu probe de ADN genomic, deoarece identificarea alelelor unei persoane la nivelul unui anumit locus al genei poate fi realizată folosind diferite metode, incluzând metode de genotipare pe bază de electroforeză în gel, cum ar fi reacția de polimerizare în lanț (PCR) polimorfismul lungimii fragmentelor de restricție (PCR-RFLP), PCR cu alele specifice, genotipare pe bază de coloranți fluorescenți omogeni (metoda TaqMan sau metoda Invader), spectrometria de masă şi tehnologia ADN microarray (ADN cip) [Brennan, 2002; Kwiatkowski şi colab., 1999].

Genotiparea necesită mai puțin timp decât fenotiparea, nu este influențată de interacțiunile medicament-medicament sau aliment-medicament şi nu există probleme cu compliança subiecților din test. Pe de altă parte, numai polimorfismele bine investigate pot fi determinate, aşa cum diferite alele s-au dovedit a codifica enzime ce induc un polimorfism metabolic, şi trebuie să fie disponibilă secvența informațională a alelelor mutante şi wild-type (de tip sălbatic) . O analiză de corelație cu rezultatele de la fenotiparea corespunzătoare este întotdeauna necesară pentru a demonstra valabilitatea procedurii de genotipare. Relevanța fenotipării şi genotipării

constă în potențialul lor de a anticipa înainte de începerea tratamentului cu un medicament dacă un pacient are sau nu un risc terapeutic crescut sau un beneficiu terapeutic scăzut datorită predispoziției genetice. În practică, însă, o serie de provocări rămân. De exemplu, aplicarea unui proceduri de genotipare şi fenotipare la acelaşi individ poate produce rezultate neconcordante. În mod similar, rezultatele fenotipării pot fi influențate de tipul metodei şi/sau medicamentul sondă. În consecință, numeroşi autori au remarcat că procedurile de genotipare şi fenotipare trebuie să fie selectate şi efectuate atent [Zaigler şi colab.,2000].

12.5. Polimorfismul genetic al enzimelor de metabolizare a medicamentelor (DMEs)

Cea mai mare parte a cunoştințelor farmacogenetice au fost dobândite în domeniul DMEs. De ce? pentru că polimorfismele DME sunt cel mai adesea trăsături monogenice, pentru că efectul individual rezultat, de exemplu, rata metabolică, poate fi uşor analizat cantitativ şi pentru că fenotipurile caracterizate prin diferențe interindividuale ale ratei metabolice pot fi sesizate cu uşurință. Este posibil să se distingă persoanele cu metabolism normal, care sunt în mod implicit EMs, de metabolizanții/metabolizatorii PMs, la care s-a redus semnificativ activitatea DME. În unele cazuri, este de asemenea, posibil să discrimineze persoanele cu metabolism crescut, care sunt clasificate ca metabolizanți/metabolizatori ultrarapizi (UMs).

Potentialele consecințe ale metabolismului medicamentelor polimorfice includ [Meyer, 2000]:

- efect farmacologic extins;
- reacții medicamentoase adverse;
- lipsa de activare a precursorilor,
- toxicitatea medicamentului;
- creşterea dozei eficace;
- metabolizare alternativă, căi nocive;
- interacțiuni medicament-medicament exacerbate.

DMEs sunt de obicei clasificate în funcție de tipul modificării metabolice pe care o catalizează. Enzimele de faza I catalizează transformările de grup funcțional, cum ar fi oxidarea, reducerea sau hidroliza. Enzimele de faza a II-a catalizează conjugarea substanțelor cu substituenți endogeni. Pentru că, DMEs de faza a II- sunt întotdeauna implicate în eliminarea substanțelor bioactive şi metaboliții acestora, ne putem aştepta că activitatea enzimatică scăzută va conduce la creşterea sistemică a nivelurilor de medicament, care pot fi asociate cu un efect terapeutic crescut, dar de asemenea cu creşterea efectelor adverse şi a toxicității. În cazul enzimelor de fază I, consecințele polimorfismului depind dacă DME catalizează inactivarea unui medicament activ, sau formarea unui metabolit activ, fie dintr-un medicament fie dintr-un precursor. Contribuția relativă individuală a DMEs la metabolismul global de fază I sau II este redată în figura 12.1.

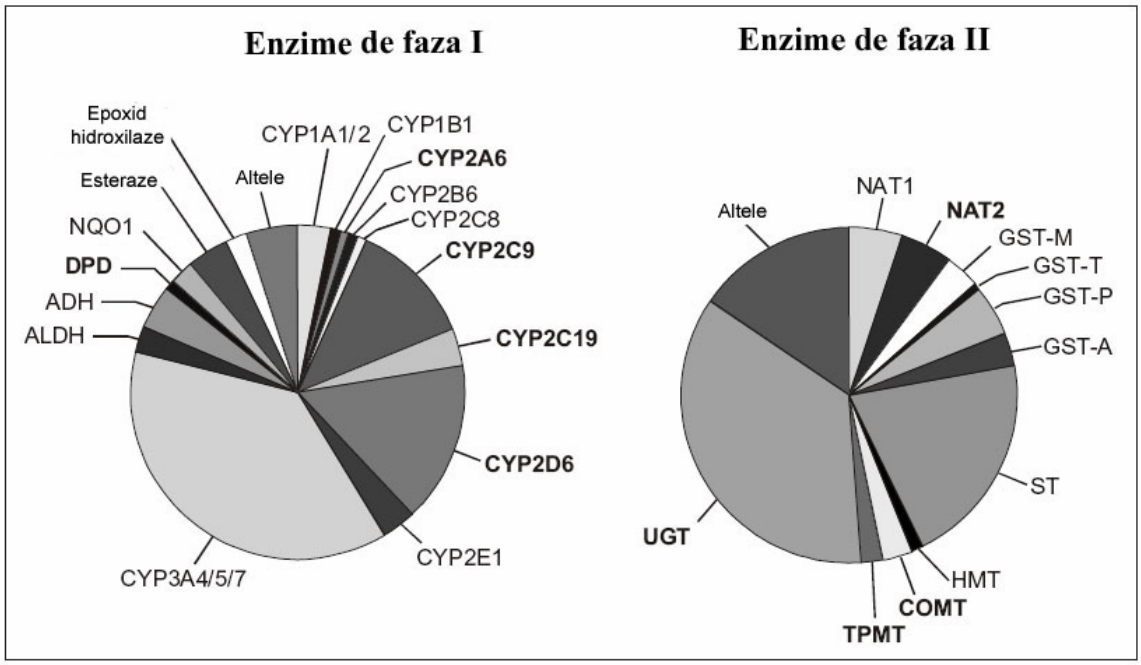


Fig. 12.1 Contribuția relativă individuală a DMEs în faza I sau II a metabolismului medicamentelor (modificate după [Evans şi Johnson, 2001]). Mărimea secțiunii în graficul figură indică procentul de metabolism de fază I şi II al medicamentelor la care contribuie enzima respectivă. Enzimele cu polimorfisme la care s-a demonstrat deja că determină diferențe relevante din punct de vedere clinic în răspunsul la medicamente sunt tipărite cu caractere bold.

Abrevieri: ADH = alcool dehidrogenaza; ALDH = aldehid dehidrogenaza; CYP = citocromul P450; DPD = dihidropirimidin dehidrogenaza; NQOH1 = NADPH: quinon oxidoreductaza; COMT = catecol-O-metiltransferaza; GST = glutation S-transferaza; HMT = histamin metiltransferaza; NAT = N-acetiltransferaza; ST = sulfotransferaza; TPMT = tiopurin metiltransferaza, UGT = uridin 5'- trifosfat glucuronoziltransferaza.

Aproape toate DMEs prezintă polimorfism genetic. Cu toate acestea, nu toate polimorfismele s-au demonstrat a fi relevante clinic. În general, importanța clinică a metabolismului/răspunsului medicamentului polimorfic creşte sau descreşte în raport terapeutic pentru un medicament dat. Au fost publicate o serie de reviewuri excelente despre farmacogenetica DMEs (vezi capitolul 15). Prin urmare, o descriere detaliată despre polimorfismul DMEs se va concentra pe CYP2D6. O privire de ansamblu asupra diferitelor polimorfisme cunoscute ale DMEs este prezentată în tabelul 12.1.

Tabelul 12.1 Polimorfismul DMEs

Gena/ produsul genei	**Substratul medicamentos (efect)**
DMEs de fază I	
CYP1A1	Fenacetina
CYP1A2	Acetaminofen Amonafida Cafeina Paraxantina Etoxiresorufin Propranolol Fluvoxamina
CYP1B1	Metaboliți estrogeni
CYP2A6	Cumarina Nicotina (dependența de țigară) Halotan
CYP2B6	Ciclofosfamida Aflatoxina Mefenitoin
CYP2C9	Tolbutamida (hipoglicemia) Warfarina (variații al efectului anticoagulant al warfarinei, hemoragie) Fenitoina (toxicitate crescută) Antiinflamatoare nesteroidiene Diazepam Ibuprofen Glipizida (hipoglicemia) Losartan (scăderea efectui antihipertensiv)
CYP2C19	Mefenitoina (PM: toxicitate crescută, EM:eficacitate scăzută) Omeprazol (PM: toxicitate crescută, EM: eficacitate scăzută, rate de vindecare mai mari în combinație, când este luată cu claritromicina) Hexobarbital (PM: toxicitate crescută, EM: eficacitate scăzută) Mefobarbital (PM: toxicitate crescută, EM: eficacitate scăzută) Propranolol (PM: toxicitate crescută, EM: eficacitate scăzută) Proguanil (PM: toxicitate crescută, EM: eficacitate scăzută) Fenitoina (PM: toxicitate crescută, EM: eficacitate scăzută) Citalopram (PM: toxicitate crescută, EM: eficacitate scăzută) Diazepam (PM: toxicitate crescută, sedare prelungită, EM: eficacitate scăzută) Benzodiazepine

CYP2D6	β-blocante (efect β-blocant) Propranolol (PM: bradicardie, hipotensiune arterială) Timolol (PM: eliminare scăzută- acumularea de compuşi iniţiali au ca rezultat toxicitate, bradicardie, hipotensiune arterială) Bufuralol (PM: eliminare scăzută acumularea de compuşi iniţiali au ca rezultat toxicitate, bradicardie, hipotensiune arterială) Metoprolol (variaţie în activitatea de β blocare, PM: eliminare scăzută, acumularea de compuşi iniţiali au ca rezultat toxicitate, bradicardie, hipotensiune arterială) Antipsihotice (diskinezie tardivă de la antipsihotice, PM: toxicitate crescută, UM: eficacitatea insuficientă) Desipramina (PM: toxicitate crescută, hipotensiune arterială, stupoare, UM: eficacitate insuficientă) Nortriptilina (PM: toxicitate crescută, hipotensiune arterială, UM: eficacitate insuficientă) Amitriptilina [PM: scăderea eliminării de compuşi iniţiali şi metaboliţi activi (activ=nortriptilina), toxicitate crescută, hipotensiune arterială, UM: eficacitate insuficientă] Imipramina [PM: scăderea eliminării metabolitului activ (=desipramina)] Clomipramină (PM: eliminare scăzută - acumularea de compuşi iniţiali ce au ca rezultat toxicitate) Codeina [PM: lipsă de eficacitate ca analgezic, scăderea activării medicamentului (activ =morfina) reacţii adverse narcotice, dependenţă] Debrisoquina (PM: toxicitate crescută, hipotensiune arterială, tensiune ortostatică apreciabilă, UM: eficacitate insuficientă) Dextrometorfan (PM: toxicitate crescută UM: eficacitate insuficientă) Encainida (PM: scăderea activării medicamentului (activ=O-desmetil encainida), EM: lărgirea complexului QRS) Flecainida (PM: eliminare scăzută- acumularea de compuşi iniţiali au ca rezultat toxicitate crescută, β-blocadă inconsistentă, UM: eficacitate insuficientă) Fluoxetin (PM: toxicitate crescută, UM: eficacitate insuficientă) Guanoxan (PM: toxicitate crescută, hipotensiune arterială, UM: eficacitate insuficientă) Metoxiamfetamina (PM: toxicitate crescută, UM: eficacitate insuficientă) Nortriptilina (PM: scăderea eliminării- acumularea de compuşi iniţiali ce au ca rezultat creşterea toxicităţii, UM: eficacitate insuficientă) N-propilajmalina (PM: toxicitate crescută, UM: eficacitate insuficientă) Perhexilina (PM: toxicitate crescută, neuropatie periferică, agranulocitoză, UM: eficacitate insuficientă) Fenacetina (PM: toxicitate crescută, UM: eficacitate insuficientă) Fenformin (PM: toxicitate crescută, acidoză lactică, UM: eficacitate insuficientă) Propafenona (PM: toxicitate crescută, UM: eficacitate insuficientă) Sparteina (PM: eliminare scăzută - acumularea de compuşi iniţiali ce au ca rezultat creşterea toxicităţii, depresie cardiacă, contracţii uterine, UM: eficacitate insuficientă) Mexiletina (PM: eliminare scăzută - acumularea de compuşi iniţiali ce au ca rezultat creşterea toxicităţii)

	Amiodarona Indoramina Perfenazina (PM: eliminare scăzută - acumularea de compuşi iniţiali, de origine ce au ca rezultat toxicitate) Zuclopentixol (PM: eliminare scăzută - acumularea de compuşi iniţiali ce au ca rezultat toxicitate) Itioridazina Carvedilol (variaţii în blocada α1/β2) Antiaritmice (proaritmic şi alte efecte toxice)
CYP2E1	N-nitrozodimetilamina Acetaminofen Etanol (posibil efect asupra consumului de alcool)
CYP3A4/A5/A7	Macrolide Ciclosporina Tacrolimus Blocante ale canalelor de calciu Midazolam Terfenadina Lidocaina Dapsona Quinidina Triazolam Etoposid Teniposid Lovastatin Alfentanil Tamoxifen Steroizi
ALDH2	Ciclofosfamida Etanol (metabolizatori lenţi: înroşirea feţei, metabolizatori rapizi: protecţie faţă de ciroză hepatică)
ALDH3	Etanol (creşterea consumul de alcool şi dependenţă)
DPD	Fluorouracil (posibil toxicitate sporită, 5-fluorouracil neurotoxicitate, mielotoxicitate)
NQO1	Ubiquinona Menadiona (urolitiază asociată menadionei) Mitomicina c
Pseudocolinesteraza plasmatică	Succinilcolina (hidroliză lentă a esterilor: apnee prelungită)
COMT	Levodopa (metilatori săraci: răspuns crescut) Metildopa(metilatori săraci: răspuns crescut) Estrogeni (abuz de substanţe) Acid ascorbic
GSTM1	Aminocrom Dopacrom Adenocrom Noradrenocrom
GSTP1	Acid 13-cis-retinoic Acid etacrinic Acroleina Epirubicina
HMT	Histamina

NAT1	Acid p-aminosalicilic Acid p-aminobenzoic Sulfametoxazol
NAT2	Izoniazida [EM (autozomal dominantă): hepatită, PM: (autozomal recesivă): neurotoxicitate isoniazidică, lupus eritematos, neuropatie periferică, inhibarea oxidazei hepatice, creşterea toxicității fenitoinei atunci când este coadministrată] Hidralazina (PM: lupus eritematos indus de hidralazină) Procainamida (PM: dezvoltarea lupusului eritematos mai devreme şi mai frecvent) Fenelzina (PM: greață, somnolență) Sulfasalazina (PM: reacții severe, mai probabil, atunci când sunt folosite doze mari) Dapsona (PM: efecte hematologice) Sulfonamide (hipersensibilitate la sulfonamide) Cafeina Amonafida (acetilatori rapizi: eficacitate scăzută, toxicitate crescută, mielotoxicitate, cancer colorectal)
STs	Steroizi Acetaminofen Estrogeni Dopamina Epinefrina Naringenina
TPMT	6-mercaptopurinA (PM: toxicitate tiopurinică şi eficacitate, risc de cancere secundare, mielotoxicitate, toxicitate hematopoietică, reducere a măduvei osoase) 6-tioguanina (PM: toxicitate tiopurinică şi eficacitate, risc de cancere secundare, mielotoxicitate, toxicitate hematopoietică) Azatioprina (PM: toxicitate tiopurinică şi eficacitate, risc de cancere secundare, mielotoxicitate, toxicitate hematopoietică)
UGT1A1	Irinotecan (diaree, mielosupresie) Bilirubina Flavopiridol
UGT2Bs	Opioizi Androgeni Morfină Naproxen Ibuprofen

12.6. Polimorfismul CYP2D6

Polimorfismul CYP2D6 a fost pentru prima oară descoperit prin observarea diferențelor interindividuale în metabolismul debrisoquinei şi sparteinei. Ambele medicamente, la fel ca desipramina şi metoprololul, au fost folosite pentru a fenotipa subiecții [Tamminga şi colab., 2001; Lledo, 1993], permițând a distinge PMs de EMs. În unele cazuri UMs ar putea fi, de asemenea, discriminat [Lovlie, 2001].

Gena umană CYP2D6 este localizată la om la nivelul locusului CYP2D de pe cromozomul 22 [Gough, 1993], care conține, de asemenea, alte două gene, o genă (CYP2D7), ce conține o mutație care lezează cadrul de lectură, precum şi o pseudogenă (CYP2D8P), care conține mai multe mutații şi nu codifică o enzimă funcțională [Kimura, 1989]. În prezent sunt cunoscute mai mult de 75 de variante alelice ale CYP2D6 ; cu toate acestea, multe dintre variantele genetice nu produc efecte măsurabile la nivel de proteină (compilații de diverse alele ale CYP2D6 şi alte CYPs sunt disponibile pe internet la websitul Comisiei de Nomenclatură al Alelelor Citocromului P450 (CYP) http://www.imm.ki.se/cypalleles).

Există cinci alele cu mutații silențioase determinate de modificarea unui singur nucleotid. De obicei alela numită CYP2D6 * 2 [Tsuneoka, 1993] cuprinde un grup de alele cu diverse mutații care au ca rezultat schimbarea nivelului enzimatic în acelaşi mod (Arg296→Cys şi Ser486→ Thr). Enzima codificată de CYP2D6 * 2 are o activitate de aproximativ 80% comparativ cu tipul sălbatic. Alte alele ce codifică o enzimă funcțională sunt CYP2D6*33 şi CYP2D6*35 [Marez., 1997]. Toate aceste alele pot fi clasificate ca fiind corespunzătoare funcțional activității enzimei codificate. Alelele funcționale sunt asociate cu fenotipul EM.

Până în prezent au fost descrise 23 de alele, care codifică o enzimă inactivă. În consecință, acestea pot fi clasificate ca alele non-funcționale. Pierderea activității enzimatice este cauzată de diferite mecanisme, cum ar fi decalarea cadrului de citire (de exemplu, CYP2D6 * 3A, CYP2D6 * 6, CYP2D6 * 41), defecte de splicing (de exemplu, CYP26D6 * 4) sau codon stop (CYP2D6 * 8). În cazul alelei CYP2D6 * 5, gena completă este pierdută. Alelele non-funcționale sunt asociate cu fenotipul PM. Şase alele (CYP2D6 * 9, CYP2D6 * 10A, CYP2D6 * 10B, CYP2D6 * 17, CYP2D6 * 36, CYP2D6 * 41) sunt cunoscute, a codifica o enzimă cu activitate scăzută, comparativ cu tipul sălbatic. Aceste alele cu funcționare redusă au fost asociate cu un fenotip intermediar de metabolizare [Kagimoto, si colab., 1990].

În cele din urmă, există, de asemenea, alele în care gena completă CYP2D6 a fost duplicată sau chiar multiplicată. În aceste cazuri, unde genele ce codifică enzima complet activă sunt amplificate, adică CYP2D6 * 1XN, CYP2D6 * 2XN şi CYP2D6

* 35X2, rezultatul este o creştere a sintezei enzimei. În consecință, alelele acestea sunt asociate cu un fenotip UM [Dahl, şi colab., 1995]. Activitatea alelei CYP2D6 variază semnificativ printre grupurile de rase/etnii [Bradford, 2002]. S-a observat că există o frecvență semnificativ mai mare de alele nonfuncționale la caucazieni în comparație cu alte populații (26% față de 6% la asiatici şi africani). În consecință, purtătorii homozigoți ai alelei, reprezintă 6-7% din populația caucaziană. Cele mai importante dintre alelele nonfuncționale sunt CYP2D6*4 şi CYP2D6*5. Alelele cu funcție redusă sunt mult mai frecvente în Asia şi Africa decât în populația caucaziană. Alelele CYP2D6*10 sunt abundente în populațiile asiatice (41%), dar prezente numai la 3% din caucazieni. Alele moştenite cu funcție amplificată există, cu o frecvență destul de scăzută, în toate populațiile.

CYP2D6 contribuie în mod semnificativ la metabolismul oxidoreducător general la bărbat (aproximativ 25% din toate medicamentele prescrise, vezi figura 12.1), deşi este doar o formă relativ minoră în ficatul uman, cu o abundență de numai 1,5% . De când CYP2D6 a fost, de asemenea, găsită în creier [Gilham, 1997], este posibil ca aceasta să acționeze ca un mecanism de apărare, protejând sistemul nervos central, de neurotoxinele din mediu. CYP2D6 catalizează metabolismul primar pentru o mare varietate de droguri, inclusiv antidepresive triciclice (TCAs), antiaritmice, β-blocante şi codeină, şi prin urmare sunt susceptibile a fi influențate de polimorfismul DME. Următoarele exemple vor ilustra relevanța clinică a polimorfismului CYP2D6.

- Metabolismul TCAs, cum ar fi nortriptilina, desipramina şi imipramina urmează o schemă comună, în care hidroxilarea de către CYP2D6 conduce la inactivarea medicamentelor [Jann, Cohen, 2000]. În consecință, tratamentul cu doze normale pot expune PMs tratați cu debrisoquină la risc crescut de toxicitate, iar doza standard la UMs ar putea eşua în a realiza efectul farmacodinamic dorit. De asemenea, este important din punct de vedere clinic că un număr de medicamente antidepresive, de exemplu, fluoxetina, haloperidolul şi paroxetina, sunt inhibitori ai CYP2D6 [Brøsen, Gram, 1993]. Acest lucru ar putea duce

la creşterea toxicității dacă TCAs sunt coadministrate cu astfel de medicamente.

- În mod similar, agenții β-blocanți, cum ar fi metoprololul sunt inactivați de CYP2D6 [Lee, şi colab., 1990]. PMs ai debrisoquinei sunt supuşi unor concentrații mai mari de medicament activ şi, în consecință, creşte β-blocarea.
- În cazul propafenonei din clasa de antiaritmice 1c, polimorfismul CYP2D6 conduce la o schimbare de profil farmacodinamic [Lee şi colab., 1990]. Farmacodinamic, propafenona acționează atât ca blocant al canalelor de sodiu, cât şi ca β-blocant. Medicamentul este racemic şi, în timp ce ambii enantiomeri exercită blocade ale canalelor de sodiu comparabile, activitatea de β blocare este limitată la izomerul S. CYP2D6 catalizează hidroxilarea propafenonei. Produsul, 5-hidroxipropafenona, este un metabolit activ, care este în principal un blocant al canalelor de sodiu, dar are de asemenea o activitate limitată de β blocare. PMs ai propafenonei sunt supuşi la o β-blocadă crescută şi la un risc înalt de evenimente adverse severe, comparativ cu EMs.
- Medicamentul carvedilol este un amestec racemic de doi enantiomeri cu farmacodinamică şi metabolism diferită. Enantiomerul S arată α1-activitate precum şi β2-activitate, în timp ce enantiomerul R este în primul rând β-blocant. Izomerul R este metabolizat de către CYP2D6 într-o mult mai mare măsură decât enantiomerul S. Ca rezultat activitățile relative α1/β2 sunt dependente de genotipurile CYP2D6 ale pacienților tratați [Swynghedauw, 2001].
- Efectul analgezic al codeinei este mediat prin metabolitul activ morfina. Deoarece codeina este O-demetilată la morfină de CYP2D6, efectul analgezic dorit este dependent de genotipul CYP2D6. În consecință, un efect analgezic după tratamentul cu codeină este limitat la EMs (EMs arată o mult mai mare eficacitate decât PMs măsurată prin ventilația pe minut în condiții de odihnă) [Sindrup, Brøsen, 1996].

12.7. Polimorfsmul genetic al transportorilor de medicamente

În contrast cu DMEs, până în prezent nu sunt cunoscute multe despre polimorfismul transportorilor de medicamente. Transportorii membranari sunt responsabili de absorbția medicamentelor în tractul gastro-intestinal, excreția urinară sau biliară, transportul de o parte şi de alta a barierei hemato-encefalice şi la nivelul situsurilor de acțiune, cum ar fi țesutul cardiovascular, celulele tumorale şi microorganismele infecțioase. În consecință polimorfismul transportorilor poate influența biodisponibilitatea medicamentelor. Transportorii includ glicoproteina P (P-gp; MDR1), α1 acid glicoproteina, MRP1-6 (proteina de rezistență multiplă la medicamente) şi perechea ei P-gp (SP-gp).

12.8. Gena de rezistență multiplă la medicamente (MDR) – marker versus polimorfismul funcțional

Gena MDR1 codifică glicoproteina P (P-gp), o proteină membranară cu apartenență la superfamilia de transportori membranari de legare la adenozin trifosfat [Choi, şi colab., 1988]. P-gp contribuie la excreția xenobioticelor de la nivelul rinichilor, ficatului şi intestinului. În celulele endoteliale ale sistemului nervos central împiedică pătrunderea medicamentelor de o parte şi alta a barierei hematoencefalice. Supraexprimarea P-gp în celulele tumorale are ca rezultat un fenomen cunoscut ca rezistență multiplă la medicamente, la agenții antineoplazici. Medicamentele cunoscute a fi eliminate prin P-gp, includ digoxina, antraciclina, vinblastina, daunomicina şi ciclosporina A. Polimorfismul genei MDR1 ce influențează nivelul de exprimare sau secvența proteinei P-gp, ar putea avea prin urmare, un impact asupra biodisponibilității acestor medicamente.

Gena MDR1 conține 28 de exoni, ADNc constând din 3843 bp. Până în prezent, 16 alele au fost identificate; cu toate acestea, cea mai mare parte a polimorfismelor detectate sunt intronice sau silențioase [Cascorbi şi colab., 2001]. Interesant, un polimorfism mononucleotidic silențios în exonul 26 (C3435T) a fost asociat cu nivelul de exprimare al P-gp la nivel intestinal şi biodisponibilitatea orală a digoxinei [Hoffmeyer şi colab., 2000].

Persoanele cu genotipul TT au arătat o expresie semnificativ redusă a nivelului de P-gp, comparativ cu persoanele cu genotip CC. Astfel, după administrarea pe cale orală, valorile Cmax digoxinei au fost mai mari în cazul genotipului TT, comparativ cu genotipul CC. Într-o investigare a distribuției polimorfismului MDR1 în populația albă, SNP C3435T par a fi cele mai frecvente polimorfisme, cu mai mult de 50% heterozigoți şi 28% homozigoți purtători ai variantei alelice. Alte studii au arătat că polimorfismul C3435T este supus unei remarcabile variații interetnice [Ameyaw , şi colab., 2001]. Având în vedere că SNP C3435T nu poate determina o schimbare de aminoacizi la nivelul proteinei, cel mai probabil este, un polimorfism marker pentru un polimorfism funcțional. Un candidat potențial este un SNP nonsinonim în exonul 16 (G2677T), care este în dezechilibru de linkage cu SNP C3435T SNP. Polimorfismul G2677T a fost asociat cu creşterea funcției P-gp *in vitro* şi concentrații plasmatice mai mici de fexofenadină [Kim, şi colab., 2001]. Întrucât aceste observații sunt contradictorii pentru efectele digoxinei raportate, sunt necesare mai multe investigații pentru a elucida contribuția diferitelor polimorfisme MDR1 în biodisponibilitatea la medicamente.

Câteva exemple de polimorfisme ale transportorilor de medicamente sunt redate în tabelul 12.2.

Tabelul 12.2. Polimorfismul transportorilor de medicamente

Gena/Produsul genei	**Substratul medicamentului (efect)**
MDR-1	Medicamente produse natural anticancerigene Vinblastina (supraexprimare în cancer: rezistență la medicamente) Doxorubicina (supraexprimare în cancer: rezistență la medicamente) Paclitaxel (supraexprimare în cancer: rezistență la medicamente) Substraturi CYP3A4 Digoxin Fexofenadină
BSEP	conjugați
MRPs	Glutation Conjugați glucuronid Conjugați sulfat Antivirale nucleozide

12.9. Polimorfismul genetic al țintelor medicamentelor

Polimorfismul țintei unui medicament influențează direct efectele farmacodinamice ale medicamentului. Identificarea şi investigarea polimorfismului printre țintele medicamentelor este o sarcină complicată, pentru că, cel puțin în condiții *in vivo*, efectul măsurabil al medicamentului este mai mult sau mai puțin sub control poligenic, ceea ce face dificilă segregarea fenotipurilor implicate. În ciuda acestui fapt, au existat numeroase încercări de a stabili relații între polimorfismele izolate într-o singură genă ce codifică ținta unui medicament şi răspunsul anticipat al medicamentului .

Unele din aceste încercări au avut succes, în timp ce altele au arătat inconsecvențe de-a lungul studiului, sugerând că în aceste cazuri sunt implicate mecanisme genetice mai complexe. Acest lucru va fi ilustrat prin exemplele următoare.

12.9.1. Polimorfismul proteinei de transfer a esterilor de colesterol (CETP) ca biomarker la răspunsul terapiei de scădere a lipidelor

CETP, care este implicată în controlul plasmatic al nivelurile de lipoproteine cu densitate înaltă (HDL), s-a dovedit a fi polimorfică. Polimorfismul CETP include un polimorfism de restricție în intronul 1 din gena CETP, numit TaqIB. Prezența situsului de restricție este denumită B1 şi absența lui este denumită B2. La caucazieni, 30% din populație sunt purtători ai genotipului B1B1 şi respectiv, 19% ai genotipului B2B2, ceea ce corespunde la o frecvență de 59% pentru alela B1 şi 41% pentru alela B2 [Kuivenhoven, şi colab., 1998].

Varianta B1 a genei CETP a fost asociată cu concentrații plasmatice ridicate ale CETP şi mai mici de HDL decât în cazul variantei B2. În plus, s-a constatat o asociere între alelele B1 şi un grad mai mare de ateroscleroză coronariană, cu progresia cea mai pronunțată a aterosclerozei la purtătorii B1B1, un grad intermediar de progresie la purtătorii B1B2 şi cu progresia cea mai redusă la purtătorii B2B2.

Terapia cu pravastatin încetineşte progresia aterosclerozei coronariene la transportorii B1B1, dar nu şi la purtătorii B2B2 (reprezentând 16% din pacienții care iau pravastatin).

Acest lucru a sugerat că polimorfismul CETP pare a anticipa dacă bărbații cu boli coronariene ar putea beneficia de tratamentul cu pravastatin pentru a întârzia progresia aterosclerozei coronariene. Totuşi, de când polimorfismul TaqIB este localizat la nivel intronic în gena CETP, o relație de cauzalitate între genotip şi răspunsul la medicamente pare să fie exclus.

Este mult mai probabil ca acest polimorfism să constituie un marker nefuncțional, care este în dezechilibru de linkage aproape complet cu polimorfismul CETP /-629, un polimorfism funcțional în regiunea promotorului genei CETP [Maitland-van der Zee şi colab., 2002].

12.9.2. Receptorul β2-adrenergic: predictibilitatea haplotipului versus SNPs

S-a demonstrat că efectul bronhodilator al agoniştilor receptorului β2-adrenergic este condiționat de polimorfismul receptorilor. Receptorul β2-adrenergic, un exemplu tipic de receptor cuplat cu proteina G, interacționează cu cotecolaminele endogene şi diverse medicamente. Receptorul există într-o varietate de țesuturi, şi este implicat în reglarea cardiacă, vasculară, pulmonară şi funcționarea metabolică. Activarea β2-adrenoreceptorilor în plămâni are ca rezultat relaxarea musculaturii netede a căilor respiratorii şi, astfel, agoniştii β2-adrenoreceptorilor sunt frecvent utilizați ca bronhodilatatori la astmatici.

Multiple mutații în gena β2-adrenoreceptorului sunt cunoscute, iar unele dintre ele sunt în dezechilibru de linkage. Un studiu recent a identificat un total de 13 SNPs organizate în 12 haplotipuri [Drysdale şi colab., 2000]. Au fost mai multe încercări de a corela răspunsul la terapia cu bronhodilatatoare cu diferite polimorfisme ale genei β2-adrenoreceptorului. De exemplu, răspunsul la albuterol s-a fost dovedit a fi puternic asociat cu un SNP în gena β2-adrenoreceptorului, având ca rezultat schimbări de aminoacizi în receptor la nivelul codonului 16 (Arg→Gly).

Creşterea FEV1 a fost de 6,5 ori mai mare la pacienții care au fost homozigoți pentru 16Arg/16Arg comparativ cu pacienții cu genotip Gly/Gly. Totuşi această relație nu a putut fi confirmată constant de către alte studii [Tan şi colab., 1997].

Aplicând abordări de gene candidate, un alt grup de cercetători a determinat răspunsul la tratamentul bronhodilator cu albuterol la indivizii cu cele mai frecvente 5 haplotipuri de receptori β2-adrenergici. Ei au arătat că răspunsurile variază de mai mult de 2 ori şi sunt asociate în mod semnificativ cu perechile de haplotipuri, dar nu sunt legate de SNPs individuale.

12.9.3. Polimorfismul țintei unui medicament poligenic: răspunsul la tratamentul cu Clozapină

Clozapina, un antipsihotic atipic, interacționează cu o varietate de receptori pentru medicamente, de exemplu, receptorii adrenergici, receptorul dopaminergic D3 şi receptorul pentru neurotransmițătorul serotonină.

Deşi, se consideră că variația alelică a receptorului pentru neurotransmițătorul serotonină 2A (5-HT2A) este un factor în determinarea răspunsului la clozapină, aceasta nu poate explica decât parțial variațiile interindividuale [Arranz şi colab., 1998].

Un studiu implicând multiple gene candidat a fost realizat în scopul de a găsi asocieri, cu valori de predicție îmbunătățite. Au fost studiați nouăsprezece polimorfisme dintr-un set de nouă subtipuri de receptori țintă pentru clozapină plus un transportor de neurotransmițător .

Cea mai puternică asociație a fost găsită pentru o combinație de patru polimorfisme ale 5-HT2A, un polimorfism 5-HT2C, un polimorfism al promotorului transportorului de serotonină (5-HTTLPR) şi receptorului pentru histamină, conducând la 76% predictibilitate pentru răspunsul la clozapină şi o sensibilitate de 95% pentru un răspuns satisfăcător [Arranz şi colab., 2000].

Alte exemple de polimorfism ale receptorilor pentru medicamente sunt redate în tabelul 12.3.

Tabelul 12.3 Polimorfismul receptorilor pentru medicamente

Gena/ produsul genei	Substrat medicamentos (efect)
Proteina de transport a esterilor de colesterol (CETP)	Pravastatin (nivel scăzut de HDL, progresia aterosclerozei)
Receptorul β2-adrenergic	Albuterol (răspuns la astmatici, control slab al astmului) Ventolin (răspuns la astmatici, control slab al astmului)
5-HT2A	Clozapina şi alte neuroleptice (eficacitate medicamentoasă variabilă, răspuns antipsihotic tipic şi rezultate pe termen lung)
5-HT26	Clozapina (răspuns la schizofrenici)
5-HT6	Clozapina şi alte neuroleptice (răspuns la medicamente)
Transportorul serotoninei (5-HTT)	Antidepresive, de exemplu, clomipramina, fluoxetina, paroxeina, fluvoxamina (neurotransmisia 5-HT, răspuns antidepresiv)
Receptori dopaminergici D2, D3, D4	Antipsihotice, de exemplu, haloperidol, clozapina, tioridazina nemoraprida [răspuns antipsihotic (D2, D3,D4), diskinezie tardivă indusă de antipsihotice (D3), akatizie acută indusă de antipsihotice (D3), hiperprolactinemia la femei (D2)]
5-Lipoxigenaza la nivelul promotorului (ALOX 5)	Inhibitori ai sintezei de leukotriene (răspuns la astmatici)
Enzima de conversie a angiotensinei (ACE)	Inhibitori ACE, de exemplu, enalapril, lisinopril, captopril (efecte renoprotective, reducerea bp, reducerea masei ventriculare stângi, îmbunătățirea funcției endoteliale, inhibitorii ACE induc tuse, nefropatie IgA)
Receptorul pentru bradikinina B2	Inhibitori ACE (inhibitorii ACE induc tuse)
Stromelizina	Pravastatin (eficacitate în ateroscleroza coronariană şi restenozare)
β-Fibrinogen	Pravastatin (progresie scăzută a bolii coronariene arteriale)
Lipaza hepatică	Lovastatin / colestipol sau niacin / colestipol (îmbunătățirea stenozei coronariene)
Receptorul pentru sulfoniluree	Tolbutamida (eliberare de insulină indusă de sulfoniluree, răspuns la insulină şi peptidul C seric)
Canalul HERG	Quinidina (sindrom de QT lung indus de consumul de medicamente)
Canalul KvLQT1	Terfenadina (sindrom de QT lung indus de consumul de medicamente) Meflaquina (sindrom de QT lung indus de consumul de medicamente) Disopiramida (sindrom de QT lung indus de consumul de medicamente) Cisaprid (polimorfismul Y315C torsada vârfurilor)
Canalul hKCNE2	Bactrim quinidina (aritmie indusă de medicamente) Bactrim (aritmie indusă de medicamente) Procainamida(aritmie indusă de medicamente) Oxatomida (aritmie indusă de medicamente) Claritromicina (torsada vârfurilor)

Inozitol-p1p	Litiu (răspuns la boala manico- depresivă)
Apolipoproteina E4	Simvastatin (mortalitate ameliorată) Tacrina (răspuns la boala Alzheimer)
Receptorul ryanodinic	Halotan sau succinilcolina (hipertermie malignă indusă de consumul de medicamente)
Receptorul FC trombocitar (FCR II)	Heparina (trombocitopenie indusă de heparină)
Proteina α Gs	β-blocanți, de exemplu, metoprololul (efect antihipertensiv)
Glicoproteina IIIa subunitate a receptorului glicoproteinei IIb/IIIa	Aspirină (efect plachetar) inhibitorii glicoproteinei IIb/IIIa, de exemplu, abciximab (efect antiplachetar)
Receptorul de estrogen	Estrogeni conjugați (creşterea densității minerale osoase); înlocuire hormonală (creşterea HDL)
Proteina G β3	Antidepresiv (răspuns la tratamentul antidepresiv), diuretic (efect diuretic)
α-Adducina	Diuretice (efect hipotensiv)
Angiotensinogen	Inhibitorii ACE (efect hipotensiv ??)
Gena protrombinei	Contraceptive orale (polimorfismul G20210A: tromboză venoasă cerebrală)
Factorul V	Contraceptive orale (polimorfismul G1691A: tromboză venoasă cerebrală)
Metilguanin metiltransferaza	Carmustina (răspuns al gliomului)

12.10. Concluzii

Cercetările farmacogenetice au demonstrat că polimorfismul genetic este un factor important în disponibilitatea şi răspunsul medicamentelor la om. În special în domeniul metabolismului medicamentelor, cunoştințele actuale ne permit să explicăm diferențele farmacokinetice interindividuale prin polimorfismul genetic. Cu toate acestea, elucidarea relației dintre răspunsul individual la medicamente şi genotip este mult mai dificilă din cauza naturii sale poligenice şi, prin urmare, aceasta nu poate fi realizată prin abordări de mecanisme farmacogenetice.

Strategiile care sunt capabile să abordeze polimorfismul poligenic sunt la nivel de căutări genomice pentru polimorfismele asociate cu efectele medicamentelor, utilizând hărți SNP anonime de înaltă densitate şi strategii de gene candidate, care preiau avantajul cunoştințelor existente despre farmacodinamica şi disponibilitatea medicamentelor.

În prezent, abordările candidate par a fi mai promițătoare, pentru că se concentrează pe un număr uşor de manageriat de gene şi polimorfisme care par a fi

importante, şi primele rezultate par a fi promiţătoare (de exemplu, în cazul răspunsului la tratamentul cu clozapină, aşa cum s-a prezentat anterior).

Dincolo de capacităţile tehnologice curente şi cerinţele rezonabile de resurse, abordările genomului la nivel farmacogenetic are potenţialul de a descoperi determinanţi genetici în răspunsul la medicamente într-o manieră mai cuprinzătoare şi mai precisă.

Astfel, bazat pe o mai bună înţelegere a relaţiei dintre variabilitatea genetică şi succesul terapeutic, farmacogenetica ne va permite să facem predicţii referitoare la răspunsul individual la terapia medicamentoasă. Cunoştiinţele de farmacogenetică în practica clinică ar trebui să facă posibilă selecţia cea mai potrivită a medicaţiei sau ar trebui să permită ajustarea dozelor individuale, în funcţie de genotipul fiecărui pacient. În ceea ce priveşte dezvoltarea de noi medicamente, preselecţia genetică a pacienţilor care urmează să fie recrutaţi pentru studiile clinice, în respondenţi şi nonrespondenţi ar putea ajuta la optimizarea trialurilor clinice, pentru că eliminarea nonrespondenţilor ar putea determina o reducere a numărului de pacienţi necesară pentru a se atinge semnificaţia statistică.

În cele din urmă se urmăreşte înlocuirea strategiei curente care consideră că un medicament este potrivit pentru toţi indivizii, prin terapii individualizate cu medicamente sigure care sunt administrate in funcţie de constituţia genetică specifică unui anumit pacient.

CAPITOLUL 13

FARMACOGENOMICA BIODISPONIBILITĂȚII ŞI ELIMINĂRII MEDICAMENTELOR

13.1. Introducere

Efectele interindividuale ale medicamentelor fac obiectul unei substanțiale variabilități. La baza acestei afirmații stau numeroase motive de ordin fiziopatologic, datorate interacțiunilor din mediu intern dar şi rațiuni de ordin genetic. Încă din 1953 s-a observat la pacienții care primeau un medicament tuberculostatic, şi anume izoniazida, că dozarea în urină a produsului acesteia acetilat era diferită de la un pacient la altul. Conceptul de farmacogenetică a fost elaborat prima oară în 1958 de către geneticianul german Vogel, care a observat că variabilitatea individuală a farmacocineticii se supune într-o oarecare măsură eredității familiare. De atunci, s-au obținut succese remarcabile în domeniul farmacogenomicii. În special identificarea polimorfismului genelor sistemului citocromului P450 (CYP) a contribuit considerabil la explicarea variabilității individuale a farmacocineticii pentru anumite medicamente. Mai mult, de curând au fost elucidate variațiile ereditare ale genelor transportorilor membranari ai medicamentelor. Alături de aceşti factori care pot influența farmacocinetica s-au făcut eforturi pentru clarificarea rolului polimorfismului genetic al receptorilor sau a proteinelor traducătoare de semnal cu rol în modularea eficienței medicamentelor. Farmacogenomica încearcă să elucideze interacțiunea complexă a multor gene polimorfice pentru a putea explica şi dezvolta în consecință strategii terapeutice optime, în special destinate bolilor frecvente, cum ar fi bolile cardiovasculare şi cancerul. Această încercare reprezintă pe de o parte o adevărată provocare, atât tehnică cât şi logistică, determinată de milioanele de polimorfisme nucleotidice unice (SNPs) cunoscute până acum.

13.2 Contribuția metabolismului la clearance-ul medicamentelor

13.2.1 Enzimele polimorfice ale citocromilor P/CYPs

Enzimele de faza aI[a] catalizează reacțiile de oxidare şi reducere ale componenților metabolici străini precum şi transformarea anumitor lipide şi steroizi.

Tabelul 13.1 Substratele enzimelor polimorfice ale citocromului P450, alelele importante funcțional şi frecvența lor la caucazieni [Ingelman-Sundberg, 2001]

CYP	Substrate (selectate)	Alele (ADNc relevant şi/sau varianta proteică)	Consecințe funcționale	Frecvența alelelor (%)
CYP2A6	-variate: cumarinice, nicotine	*2(T479A,L160H) *4(deleția genică) *9(T-48G)	enzimă inactivă fără enzimă expresie scăzută	1-3 1 5
CYP2B6	-citostatice: ciclofosfamida,ifosfamida benzodiazepine: diazepam, tenazepam, midazolam -variate: clopidrogel, nicotina, tamoxifen	*5(C1459T,R487C) *7(G516T,Q172H; A785G,K262R; C1459T,R487C)	activitate scăzută activitate scăzută	14 1
CYP2C8	-variate: paclitaxel, rosiglitazona	*2(A805T,1269F) *3(G416A;R139K; A1196G,K399R)	activitate scăzută activitate scăzută	0 13
CYP2C9	antiinflamat. nesteroidiene: diclofenac, ibuprofen, (S) naproxen, meloxicam, piroxicam, tenoxicam -antidiabetice orale: glibenclamid, glipizida, tolbutamina -AT1-antagonişti: irbesartan, losartan, valsartan -variate:amitriptilina, fluoxetina, fenitoina, sulfametoxazol, tamoxifen, torasemid,(S)-varfarina	*2(C430T,R144C) *3(A1075C,1359L)	activitate scăzută activitate scăzută	8-13 7-9
CYP2C1	-inhibitoare de pompă de protoni: lansoprazol, omeprazol, pantoprazol anticonvulsivante: diazepam, fenitoina, (S)-mefenitoina -antipsihotice: citalopram,clomipramina, imipramina -variate:moclobemid, proguanil, propanolol	*2(G681A, mutație a situsului de clivare) *3(G636A, stop)	enzimă inactivă enzimă inactivă	13 0

CYP2D6	-β-blocante: alprenolol, carvedilol, metoprolol, propanolol antiaritmice:propafenona, encainida, flecainida, mexiletin, sparteina -neuroleptice: haloperidol, perhexilina, perfenazina, risperidon, tioridazina -antidepresive: amitriptilina, clomipramina, desipramina, fluoxetina, fluvoxamina, imipramina, maprotilina, nortriptilina, paroxetina,codeina, dextrometorfan, tramadol, amfetamina, fenacetina metoxiamfetamina, Debrisoquine, ondasetron,	*2XN(duplicație genică) *2(R296C;S486T) *4(G1846A mutație a situsului de clivare) *5(deleție genică) *6[T1707cu decalarea cadrului de citire (frameshift)] *10(P34S) *17(T107I;R296C) *41(G-1584C)	activitate crescută activitate uşor scăzută enzimă inactivă fără enzimă fără enzimă activitate scăzută activitate scăzută expresie scăzută	1-5 12-21 4-6 1 1-2 <1 10-20
CYP2E1	-anestezice: enfluran, halotan, izofluran, metoxifluran, sevofluran, -variate: paracetamol, clorzoxazona, etanol	*2(R76H) *3(V381I) *4(V179I)	activitate scăzută enzimă inactivă enzimă inactivă	0 <1 <1
CYP3A5	se suprapun larg cu substratele CYP3A4	*3 (mutația intronului 3 A6986G la nivelul situsului de clivare)	fără enzimă	94

Enzimele CYPs sunt cele mai importante iar familia CYP3A contribuie la aproximativ 50% din totalul activității CYP la nivelul ficatului adult uman şi metabolizează aproximativ 60% din toate medicamentele uzuale. Principalul subiect al polimorfismului ereditar îl constituie genele CYP2C9, 2C19 şi 2D6 care contribuie la metabolizarea a circa 30% din medicamente (tabelul 13.1).

Mai mult, există polimorfisme cunoscute la nivelul genelor CYP1A1, 1A2, 1B1, 1A6, 2B6, 2C8, 2E1, 3A4, 3A5, 3A7, 5A1 şi 8A1 însă importanța lor funcțională rămâne controversată.

13.2.1.1. CYP2C9

La începutul anului 1999 a fost publicat un studiu în care se arăta că pacienții care au primit doze scăzute de derivat cumarinic-varfarina pentru profilaxia accidentelor trombotice au prezentat episoade semnificativ mai crescute de hemoragie decât un grup de control care a primit nişte doze superioare. Această descoperire aparent paradoxală a fost determinată de faptul că, un număr mare de metabolizatori lenți (PMs) ai CYP2C9 au fost decelați la grupul care a primit un regim cu dozaj scăzut. Clerance-ul S-enantiomerului efector al varfarinei a fost decelat ca semnificativ scăzut la aceşti pacienți determinând concentrații plasmatice intermediar crescute şi nu concentrații scăzute aşa cum era de aşteptat la pacienții care au primit doze reduse. Consecutiv, sinteza de factori de coagulare dependenți de vitamina K a fost puternic inhibată în raport cu valorile Ratei Normalizate Internaționale (INR) prezentând şi o crescută tendință la episoade hemoragice.

CYP2C9 aparține grupului de gene de pe cromozomul 10, care cuprinde CYP2C8, 2C9, 2C18 şi 2C19. Deficiența de CYP2C9 este determinată într-o mare proporție, de două mutații punctiforme care conduc la schimbul de aminoacizi: Arg144→Cys (CYP2C9*2) şi Ile359→Leu (CYP2C9*3). Frecvența alelelor la populația germanică este cuprinsă între 11 şi 7%. Homozigoți reprezentativi pentru fenotipul PMs au o prevalență de 3,2%. În mod interesant, la asiatici o schimbare alternativă de aminoacizi: Ile359→Thr a fost decelată, şi denumită CYP2C9*4. Mai mult, un polimorfism al exonului 7 (2C9*5; Asp360→Glu) [Dickmann şi colab., 2001] şi un codon stop prematur, datorat unui polimorfism de deleție 818delA care nu a demonstrat activitate (2C9*6), au fost evidențiate la populația afro-americană. Până azi, 12 alele diferite au fost recunoscute de Comitetul de Nomenclatură al Alelelor Citocromului Uman P450 (CYP). Pe lângă varfarină (prezentată însă într-o concentrație mult mai redusă- fenprocumonul) multe antiflogistice nestreroidiene cum sunt diclofenacul, ibuprofenul şi meloxicamul, antidiabetice orale ca tolbutamida şă glimenclamida, antagonişti ai receptorilor angiotensinei ca irbesartan şi losartan ca şi alte medicamente dintre care amintim fenitoina sunt metabolizate de CYP2C9 [Kirchheiner şi colab., 2003]. Există probe din ce în ce mai certe despre clerance-ul

antidiabeticelor orale care este direct dependent de genotipul CYP2C9. Consecințele nu sunt pe deplin elucidate. După administrarea de glibenclamidă zona de sub curbă (AUG) a crescut cu trei sau patru straturi, însă nivelul de glucoză la purtătorii heterozigoți de variații CYP2C9 nu a fost diferit. La purtătorii homozigoți de CYP2C9*3 aceste efecte sunt mai pronunțate şi sunt reflectate într-un răspuns accelerat la stimularea cu glucoză.

13.2.1.2. CYP2C19

CYP2C19, aşa numita mefenitoin hidroxilaza, catalizează în special hidroxilarea inhibitorilor pompei de protoni cum sunt omeprazolul şi lanozoprazolul. Pe lângă alte mutații, o mutație a situsului de clivare conduce la o inactivare completă a enzimei la 3-5% dintre caucazieni. În mod interesant, există unele dovezi că purtătorii PMs profită mai mult de terapia de eradicare a lui *Helicobachter pylori*. Doar 80% dintre pacienții purtători de tipuri sălbatice de CYP2C19 au fost tratați cu succes în timp ce purtătorii de CYP2C19*2 au prezentat toți îmbunătățiri [Kawamura, 2003]. Aceste rezultate interesante nu au putut fi însă confirmate prin alte studii însă efecte similare celor CYP2C19 dependente pot fi evidențiate în cadrul tratamentului refluxului gastroesofagian [Furuta, 2002]. CYP2C19 prezintă un polimorfism ridicat, SNPs noi fiind recent descoperite [Blaisdell, 2002]. În prezent sunt confirmate 15 alele diferite, însă majoritatea variantelor genetice identificate sunt caracterizate de o prevalență extrem de scăzută. Pe lângă mutația situsului de clivare G681A, de asemenea G636A (CYP2C19*3) ar trebui luat în considerare la alcătuirea genotipului persoanelor de rasă neagră şi orientalilor. Cu toate acestea, acest codon stop prematur, din codonul 212 apare rar la caucazieni.

13.2.1.3. CYP2D6

Pe lângă CYP3A, enzima cu înalt polimorfism CYP2D6 este una dintre cele mai studiate enzime CYP. Acum aproximativ 40 de ani s-a observat că variabilitatea interindividuală extrem de crescută a concentrațiilor plasmatice ale nortriptilinei are un fundal genetic extrem de puternic şi este bazată pe ratele metabolice diferite de la

individ la individ (pentru detalii vezi Bertilsson şi colab., 2002). Ulterior s-a demonstrat că metabolismul debrisochinei, medicament antihipertensiv, şi al sparteinei, un antiaritmic, este polimorfic iar metabolizarea este realizată de către aceeaşi enzimă CYP2D6. În special antidepresivele şi neurolepticele, care prezintă un număr considerabil de efecte adverse, sunt de asemenea metabolizate de către hidroxilaza sparteinei/debrisochinei. Prin urmare, a devenit clar într-un timp scurt că această trăsătură genetică poate avea consecințe clinice severe. CYP2D6 este azi cunoscută a fi una dintre cele mai importante gene polimorfice implicate în metabolismul medicamentelor. Aproximativ 7-10% din populația europeană a PMs prezintă CYP2D6 şi un metabolism redus pentru numeroase medicamente asemenea antiaritmicelor, antidepresivelor, neurolepticelor şi de asemenea pentru unele β blocante şi opiacee. În cadrul acestui subgrup, apariția efectelor secundare clinic relevante ale medicamentelor sunt mai probabile comparativ cu persoanele care prezintă metabolizatorii buni/intenşi (EMs). Lipsa ocazională a unor efecte secundare este explicată în unele cazuri pe seama fenomenului de duplicație genică şi apare la circa 1-3% din persoanele din Europa Centrală.

CYP2D6 aparține unei agregări genice a pseudogenei, puternic omolog inactivă, CYP2D7, care conține un singur cadru de citire ce perturbă inserția la nivelul primului său exon şi pseudogena reală CYP2D8. Gena CYP2D6 este legată de cromozomul 22q13.1 şi conține 9 exoni cu un cadru de citire deschis, de 1383 bp, care codifică 461 de aminoacizi. Polimorfismele sunt bine şi extensiv caracterizate de către Sachse şi colab.,(1997). Astăzi, peste 73 de haplotipuri diferite de CYP2D6 sunt înregistrate de către Comitetul de Nomenclatură al Alelelor Citocromul Uman P450 (CYP) (http://www.iim.ki.se/cypalleles). Alelele pot fi clasificate pe baza nivelului de activitate la care codifică enzimele CYP2D6 în grupuri funcționale, nonfuncționale şi cu funcționalitate redusă. Unul dintre defectele genetice primare de la nivelul locusului CYP2D este CYP2D6*4, care apare cu o frecvență de 20,7% la caucazieni. O translocație a G1846A generează o modificare a situsului de clivare la limita dintre intronul 3 şi exonul 4, determinând în continuare apariția unor noi proteine nefuncționale. Întreaga regiune de codificare suferă o deleție la 4-6% dintre

caucazieni şi alte grupuri etnice. Prin urmare, alela *5 este considerată a avea o origine străveche. Alte variante relevante sunt reprezentate de deleții ale 2549A la nivelul alelei *3 (2,0%) şi ale 1707T la nivelul alelei *6 (0,9%), generând modificări de cadru de citire. Contrastând cu aceste polimorfisme fatale, o deleție triplă a perechii de bază la nivelul alelei *9 (1,8%) nu alterează neapărat activitatea enzimei, iar un schimb al prolinei cu serina la nivelul codonului 34 este asociată cu o activitate enzimatică mai scăzută şi în mod particular cu o scădere a stabilității CYP2D6.10 [Nakamura şi colab., 2002]. Această variantă apare la 1-2% dintre caucazieni, însă reprezintă cauza majoră a activității scăzute a CYP2D6 la orientali. La rasa neagră-africană, alela *17 reprezintă una dintre motivele majore ale activității scăzute a CYP2D6.

Activitate extrem de crescută a CYP2D6 a fost identificată la circa 1-2% dintre caucazieni ca urmare a duplicației genice a alelelor *1 (*1X2) şi *2 (*2X2). În Europa de Nord prevalența scade sub 2%, însă în anumite regiuni din Spania au fost înregistrate şi frecvențe de peste 7%. În țările Arabe, precum şi în nord-estul Etiopiei, au fost raportate prevalențe ale metabolizatorilor ultrarapizi (UMs) de până la 29%. În câteva cazuri au existat familii cu peste 13 copii genice identificate. În contrast, în China, duplicațiile genei CYP2D6 sunt extrem de rare, dar media ratei de metabolizare a debrisochinei/4-hidroxidebrisochina este mai crescută decât la caucazieni. Acest fapt se datorează prevalenței crescute a variantelor alelice CYP2D6 *10 puțin active. Cu toate acestea, la populația de culoare pare să existe o heterogenitate extinsă.

Fenotipul metabolizatorilor intermediari (IMs) poate fi şi rezultatul ratelor de expresie scăzute ale CYP2D6, spre exemplu există dovezi considerabile că homozigoții cu polimorfism C/G 1584, prin contrapoziționarea codonului strat, prezintă o expresie proteică de doar 50%, comparativ cu purtătorii variantei 1584G [Zanger şi colab., 2001]. Această variantă CYP2D6*2 linkată, denumită CYP2D6*41 poate îmbunătăți activitatea aşa numiților IMs.

Până acum au fost raportate multe alele, însă unele extrem de rare au fost evidențiate doar la populații specifice [Ingelman-Sundberg şi colab., 2001]. Deşi rata

de metabolizare a dextrometorfanului spre exemplu, poate varia foarte mult între indivizii cu acelaşi genotip, cu mai mult de un grad de magnitutidine, genotiparea realizează o valoare predictivă de încredere a statusului PM, IM, EM şi UM pentru CYP2D6. Primul caz de duplicare genică a fost identificat la un pacient care prezenta un nivel plasmatic extrem de scăzut al nortriptilinei post terapie orală. Fenotipul UM al CYP2D6 este azi bine determinat drept cauză relevantă a lipsei de răspuns la terapia antidepresivă. Clerance-ul unor asemenea medicamente cum este nortriptilina, desipramina, şi până la un anumit nivel imipramina şi amitriptilina, depinde în mod evident de polimorfismul CYP2D6. Inhibitori ai recaptării serotoninei ca fluoxetina, citalopramul sau paroxetina au fost demonstrați drept inhibitori ai CYP2D6. În mod interesant, un studiu axat pe efectele secundare asemenea miclotoniilor şi convulsiilor, post tratament cu antidepresive, nu a putut arăta nici un pacient cu un status PM al CYP2D6, însă jumătate au fost tratați concomitent cu medicamente ce aveau efecte potențial inhibitorii asupra CYP2D6.

Efectele polimorfismului CYP2D6 asupra terapiei antipsihotice par a fi mai pronunțate pe neuroleptice. Compuşi ca perfenazina, zuclopentixolul, tioridazina, haloperidolul şi risperidona sunt metabolizați până la un nivel ridicat de către CYP2D6. Purtătorii PMs par să prezinte un risc crescut de afectare de către efectele secundare asemenea simpomelor extrapiramidale [Scordo şi colab.,2002; Brockmoller şi colab., 2002]. Mai mult, eficiența antipsihoticelor pare a fi influențată de numărul de copii active ale genelor CYP2D6. Descoperirile recente au arătat că este necesară genotiparea anterioară tratamentului cu antipsihotice polimorfic metabolizate [Dahl , 2002].

Impactul enzimelor cu polimorfism ridicat asupra terapiei bolilor cardiovasculare este controversat şi pentru certificare sunt necesare mai multe date, spre exemplu propafenona prezintă o inhibiție ridicată a receptorilor β, la purtătorii PMs, şi s-a sugerat că determină efecte adverse puternice la un pacient PM pentru CYP2D6. Însă, flecainida este parțial metabolizată de CYP2D6, dar aparent comportarea electrofiziologică a inimii nu a fost influențată determinant de către genotip. β blocantele, asemenea metoprololului, şi într-o anumită măsură carvedilolul,

sunt de asemenea substraturi CYP2D6. Chiar după terapia de durată, la purtătorii PMs, media ajustată a concentrațiilor plasmatice ale metoprololului a fost de circa 6,2 ori mai mare comparativ cu purtătorii EMs [Rau şi colab., 2002]. Dintr-un studiu al efectelor adverse ale terapiei cu metoprolol, acelaşi grup de cercetători au concluzionat că efectele adverse s-ar putea datora genotipului CYP2D6, în condițiile în care, frecvența PMs a fost ridicată la un grup restrâns de pacienți care prezentau şi efecte adverse extrem de pronunțate [Wuttke şi colab., 2002]. Cu toate acestea, în prezent nu există date care să ateste dacă rezultatul clinic al terapiei cu β blocante este influențat de polimorfismul genetic al CYP2D6.

Beneficiul genotipării CYP2D6 asupra terapiei medicamentoase a fost relevat recent, în cadrul tratamentului senzației de greață şi simpomatologiei de vomă în cadrul chimioterapiei anticanceroase cu antiemeticul antagonist al receptorului 5-HT_3, topisetron [Kaiser şi colab., 2002]. Într-un studiu în care au fost incluşi 42 de pacienți, cu cancer, care primeau chimioterapie, aproximativ 32% dintre aceştia experimentau senzații de greață şi vomă. Purtătorii CYP2D6 UMs, însă, prezentau o frecvență mult mai crescută a manifestărilor de vomă după terapie. Autorii au concluzionat că tratamentul antiemetic cu topisetron sau, într-o mai mică măsură, cu odansetron ar putea fi îmbunătățit prin ajustarea dozelor prin genotiparea CYP2D6 şi că aproximativ 50 de pacienți ar trebui genotipați pentru a proteja un singur pacient de efectele emetice severe.

13.2.1.4. CYP3A

Familia CYP3A constă într-un număr determinat de enzime implicate în metabolizarea unor medicamente bine cunoscute. Din această familie fac parte enzime ca CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 fetală şi recent identificata CYP3A43. Variabilitatea interindividuală a activității totale a CYP3A este datorată în parte prezenței sau absenței CYP3A5 active. Mai puțin de o treime dintre caucazieni şi 66% din populația neagră-africană prezintă expresia CYP3A5, datorată unei schimbări G/A de bază ADN în interiorul intronului 3. Această SNP conduce la clivare alternativă şi la generarea unui codon stop prematur în exonul 3B, având drept

rezultat inactivarea CYP3A5*3. Acest polimorfism explică, cel puțin parțial, distribuția bimodală a cineticii midazolamului. Adițional, în rândul afro-americanilor a fost identificată o SNP G/A rară la nivelul exonului 7, asociată cu reducerea activității CYP3A5 (CYP3A5*6).

În afară de CYP3A5, CYP3A4 contribuie la clerance-ul midazolamului. Recent, a fost descoperit un polimorfism semnificativ funcțional al CYP3A4 (L373F) . Acesta reduce afinitatea midazolamului la CYP3A4 de la K_M de 8,7μM la 36,4μM. Mai mult SNPs nou descoperite conduc parțial la scăderea sau chiar absența expresiei. Cu toate acestea, datorită rarității acestor polimorfisme, ele nu contribuie la explicarea variabilității individuale ale activității CYP3A4. CYP3A pot fi puternic induse de medicamente ca rifampicina, carbamazepina, fenobarbitalul sau altele. Ele interacționează cu receptorul nuclear X (PXR), interacțiune uramată de dimerizarea cu receptorul α al acidului 9-*cis*-retinoic (RXRα) şi legarea la elementele responsive ale promotorului respectiv. Prin urmare, variantele genetice ale genei PXR ar putea fi implicate în determinarea variabilității activității CYP3A. Într-adevăr, PXR prezintă numeroase variante, cel puțin şase dintre ele generând schimburi de aminoacizi. Varianta 163G induce 15 falduri/împachetări la rifampicină în comparație cu doar 5 falduri la cei cu variantă 163D. Alte variante asemenea V140M şi A370T prezintă efecte de semnificație minoră. Aceste descoperiri arată importanța majoră a interacțiunii dintre gene şi mediu înconjurător, în condițiile în care, polimorfismul PXR nu afectează activitatea bazală a CYP3A însă inducția CYP3A suferă modificări. De asemenea, în polimorfismul CYP3A4, prevalența SNPurilor PXR este relativ acăzută, prin urmare activitatea CYP3A poate fi explicată doar în mică măsură, de către această variabilă.

13.2.2 Enzimele de faza aII[a]

13.2.2.1. (Aril)amine N-acetiltransferaze (NAT2)

După o perioadă relativ scurtă de la introducerea izoniazidei în tratamentul clinic al tuberculozei, s-a observat că există diferențe interindividuale considerabile în ceea ce priveşte excreția urinară a metabolitului acetilat. Enzima responsabilă, NAT2,

catalizează acetilarea unor substraturi ca sulfametazina iar aparentele diferențe interindividuale ale acetilării izoniazidei au fost cauzate de polimorfismul genetic al genei NAT2. Acetilarea lentă la oameni, s-a demonstrat a fi bazată mai degrabă pe activitatea redusă decât pe ratele scăzute de expresie. NAT2 este exprimată de regulă în ficatul uman, în timp ce gena înrudită NAT1 poate fi exprimată într-o mare varietate de țesuturi.

Studii ale fenotipului desfăşurate pe parcursul ultimelor patru decenii au relevat o variabilitate etnică a frecvenței de acetilare lentă. Extremele pot fi găsite în Africa de Nord, cu o frecvență a alelelor care codifică acetilarea lentă de 95%, iar la polul opus în regiunea Est Pacifică îndepărtată unde frecvența este de doar 11%. Aşa cum era de aşteptat, repartiția acetilatorilor lenți, la aceste populații, este cuprinsă între 90 şi 1,2%. Determinări ulterioare, datorate genotipărilor adiacente au relevat că modelul alelic diferă semnificativ între populația caucaziană, asiatică, aborigenă şi, în special, la populația de culoare. La caucazieni, alelele predominante sunt cele lente NAT2*5B (40,9%) şi *6A (28,4%) şi cele rapide *4 (23,4%). Toate celelalte alele au o frecvență mai scăzută de 3%. La asiatici, în cadrul acetilatorilor lenți, alela NAT2*6A este cea mai comună în comparație cu alela*5B, spre exemplu frecvența este de 23% pentru prima alelă în comparație cu 19% pentru a doua în Japonia. În mod interesant, mutația 857A care are loc la nivelul alelei *7B, are o frecvență de 11% la aborigenii australieni. În Africa, pe lângă mutațiile G191A, frecvent observate, poate fi de asemenea decelată o mare diversitate a halotipurilor. Pe lângă alela rapidă *4, au fost identificate de asemenea şi *12A şi *3 în probele obținute de la diferite triburi.

NAT2 este responsabilă de conjugarea unor medicamente ca izoniazida, dapsona, procainamida şi multe altele. Acetilatorul lent NAT2 se presupune a fi supus unui risc crescut de afectare datorită efectelor secundare ca neuropatia periferică post terapie cu izoniazidă sau datorită unor afecțiuni asemenea lupusului eritematos indus medicamentos şi sindromului Stevens-Johnson. Aceste afecțiuni severe pot fi cauzate, la indivizi susceptibili, de către un număr mare de medicamente implicate în metabolismul de acetilare, cu mențiunea că nu există nici o asociere cu

forma idiopatică a lupusului eritematos [Zschieschang şi colab., 2002]. Neuropatia periferică cauzată de supradozajul cu izoniazidă poate reprezenta o problemă reală în cadrul grupurilor etnice cu o frecvență crescută a acetilatorilor lenți aşa cum întâlnim în Africa de Nord. Eficiența scăzută a medicamentelor este de aşteptat să apară la cei care prezintă acetilare rapidă.

13.2.2.2. Tiopurin-S-metiltransferaza (TPMT)

Un efect secundar rar dar extrem de grav post terapie cu antimetaboliții 6-mercaptopurina şi azatioprina o reprezintă aplazia medulară severă, care poate deveni un efect secundar cu potențial letal. Detoxifierea are loc prin intervenția TPMT, o enzimă de fază aII[a] care este homozigot deficitară cu o incidență de aproximativ 1:300 de indivizi. La aceşti pacienți, metabolizarea urmează o cale alternativă apelând la 6-tioguanin nucleotida (6-TGN). Concentrațiile plasmatice ale 6-TGN sunt corelate cu severitatea efectelor secundare medicamentoase. Cu toate acestea, apare o problemă deoarece TPMT poate suferi un număr ridicat de mutații care permit doar o genotipare limitată. Până acum 8 mutații care determină schimburi de aminoacizi şi o mutație a situsului de clivare, sunt cunoscute. Aparent există chiar mai multe mutații, dar sunt puține SNPs care pot determina o PM a TPMT. Multe clinici preferă încă proceduri de stabilire a fenotipului *ex vivo*, dar cunoştințele actuale despre rarele variații şi aplicabilitatea unor tehnici cum ar fi cromatografia de denaturare de înaltă performanță, vor permite o predicție viabilă a statusului TMPT prin intermediul genotipării.

13.3. Transportorii medicamentelor: Glicoproteina P (P-gp)

Transportorii medicamentelor aparțin superfamiliei casetei de legare a ATP-ului (ABC) din membrana proteică, şi ei pot influența concentrația intracelulară a unor compuşi numeroşi dintr-o mare varietate de celule şi țesuturi. Inițial s-a observat că transportorii ABC, de tip P-gp au fost supraexprimați în celulele tumorale, conferind acestora proprietatea binecunoscută de rezistență medicamentoasă multiplă împotriva agenților antineoplazici cum sunt paclitaxelul, antraciclina, alcaloizii de

vinca şi etoposidul. Gena care codifică P-gp a fost definită prin urmare gena rezistenței medicamentoase multiple (MDR1) (ABCB1).

Cu toate acestea, este bine stabilit că P-gp este responsabilă de transportul apical al altor medicamente lipofilice variate cum sunt digoxina şi β blocantul celiprolol, şi talinolol, inhibitoare ale sintezei colesterolului ca lovastatina, atorvastatina şi simvastatina, inhitoarele proteazei HIV, indinavir şi saquinavir, opioide şi de asemenea ciclosporina A cu efect imunosupresor. Din moment ce P-gp mediază transportul acestor compuşi importanți prin membranele intestinale sau ale celulelor endoteliale de la nivelul capilarelor cerebrale, proteina poate de asemenea servi drept barieră funcțională împotriva pătrunderii medicamentelor sau poate contribui la excreție (fiind exprimată la nivelul canaliculelor hepatocitelor sau la nivelul celulelor tubulare din rinichi). Mai mult, exprimarea la nivelul celulelor endoteliale ale barierei sanguine cerebrale protejează împotriva penetrării medicamentoase la nivelul sistemului nervos central. Prin urmare şoarecii knockout P-gp prezintă dispoziții semnificativ înalte ale substraturilor P-gp.

La oameni, expresia P-gp prezintă o mare variabilitate interindividuală şi face subiectul unor interacțiuni medicament-medicament, spre exemplu agentul antituberculos rifampicina este un inductor eficient al P-gp ca şi al MRP2 datorită elementului PXR din regiunea promotor a MDR1. Inducția P-gp a fost de asemenea observată după coadministrarea de St. John Wort (extract de sunătoare folosit adesea ca antidepresiv). Pe de altă parte competiția cu verapamilul poate determina de asemenea inhibarea activității transportorului.

Deşi pare că P-gp este coreglată, sub multe aspecte, alături de CYP3A4, nu există nici o legătură cu exprimarea CYP3A4, ceea ce explică marea variabilitate interindividuală. Prin urmare identificarea variantelor genetice în cadrul genei MDR1 a stimulat un număr mare de studii care au încercat să investigheze corelația dintre expresia P-gp şi activitatea în dependență a SNPs din MDR1. MDR1 cuprinde 28 de exoni iar ADNc constă în 3843 bp. Mickley şi colab.,(1998) au descoperit SNPs cu două sensuri, o transversie G2677T în exonul 21 şi o translocație a G2995A în exonul 24 al MDR1. Aceste SNPs au condus la un schimb Ala/Ser în codonul 893 şi

respectiv o schimbare Ala/Thr în codonul 999. În mod notabil, alelele diferite au arătat exprimări similare la nivelul țesuturilor normale, liniilor celulare neselectate şi la nivelul limfoamelor maligne netratate. Studii *in vitro* au confirmat aceste observații [Kimchi-Sarfaty şi colab., 2002]. Secvenționarea sistematică a tuturor exonilor MDR1 şi ale regiunii 5' la indivizii caucazieni au relevat multiple SNPs. 12 din 15 mutații nu au avut nici un efect asupra secvenței proteice. În mod ciudat a existat o corelație semnificativă a unui polimorfism silențios la nivelul exonului 26 (C3435T) cu nivelul exprimării intestinale a P-gp şi biodisponibilitatea orală la digoxină. SNPul C3435T prezintă o frecvență a alelelor de 53,9% în cadrul unui grup de 461 de germani caucazieni, însă variază semnificativ în cadrul altor grupuri etnice. Prevalența este mult mai scăzută (0,17-0,27) la negrii-africani, în timp ce la populația orientală valorile sunt cuprinse între 0,41 şi 0,47. Aceste date se pot dovedi importante pentru determinarea probabilității diferențelor interindividuale în ceea ce priveşte răspunsul la medicamente a anumitor populații.

În codonul 893, 6 genotipuri diferite pot exista ca şi rezultat al combinațiilor celor trei alele 2677G, T şi A cu frecvențe alelice de 56,7%, 41,6% şi 1,7% conducând la aminoacizii Ala, Ser şi respectiv Thr. Studii ulterioare au identificat un număr de mutații cu frecvență variabilă şi importanță funcțională discutabilă.

Aşa cum am menționat mai sus, în investigațiile inițiale expresia P-gp a diferit semnificativ fiind dependentă de C3435T, situată într-o poziție instabilă a codonului 1145. SNP a fost asociată cu expresii scăzute ale P-gp la nivelul mucoasei umane duodenale şi activitate transportoare scăzută. Mecanismul molecular prin care C3435T influențează expresia P-gp nu este încă pe deplin înțeles din moment ce nu există nici o dovadă a unui dezechilibru genetic linkat al diferitelor variante din regiunile promotoare ale genei MDR1 sau ale secvențelor care controlează procesarea ARN-ului mesager. Cu toate acestea, descoperirea a fost susținută prin determinarea efluxului de rodamină 123 din celulele natural killer $CD56^+$ [Hitzi şi colab., 2001]. Acest efect remarcabil a fost de asemenea detectat la nivelul exonului 26 SNP, deşi este mai puțin pronunțat la pacienți cu o stare stabilă şi tratați cu 0,25mg digoxină pe zi. Purtătorii TT au prezentat o reducere cu 20% a AUC în primele 4 ore, iar

diferențele au fost mai pronunțate dacă ne gândim la haplotipurile C3435T şi G2677T. Rezultate similare au fost obținute de un studiu francez asupra digoxinei [Verstuyft şi colab., 2003].

Probabil că asemenea polimorfisme pot juca un rol important în cazul pacienților care nu răspund la tratament. Într-adevăr, Schwab şi colab.,(2003) au demonstrat o asociere cu bolile intestinale inflamatorii. Cu toate acestea, impactul funcțional al C3435T nu este consistent. Într-un studiu realizat pe 124 de germani care au suferit transplanturi renale şi care au primit o microemulsie de ciclosporină cu substrat P-gp timp de cel puțin 6 luni s-a constatat absența unor probe suficiente. AUCs nu au diferit în funcție de polimorfismul C3435T. Pe de altă parte, formula administrată conținea surfactantul nonionic Cremophor EL, care este cunoscut ca inhibitor al P-gp în ceea ce priveşte transportul paclitaxelului. Nici o asociere pentru C3435T nu a fost raportată la un grup de populație de provenienţă japoneză, la care s-a evaluat dacă expresia MDR1 se corelează cu expresia trofoblastului placentar P-gp şi asta pe 100 de placente obținute de la femei japoneze. În contrast, în alte două studii japoneze asupra cineticii digoxinei, nivelul AUC a fost semnificativ mai crescut în primele 4 ore la grupul homozigot pentru CC decât la cel pentru TT [Moriya si colab., 2002]. Studii ulterioare au investigat de asemenea efectele polimorfismului MDR1 asupra expresiei duodenale a ARNm, punând în valoare expresii mai crescute la purtătorii TT comparativ cu purtătorii CC, ceea ce ar putea explica concentrațiile scăzute de digoxină la purtătorii 3435CC. Investigațiile din cadrul unui studiu german care a testat 55 de voluntari aflați sub tratament cu β blocantul talinolol, ca şi medicament de testat, au relevat că exonul 26 SNP este de importanță minoră. Însă, schimbul de aminoacizi Ala893Thr din exonul 21 se află în corelație cu concentrații plasmatice semnificativ alterate de talinolol. La purtătorii variantelor TT/TA ale G2677T/A, valorile AUC ale talinololului oral au fost uşor dar semnificativ mai ridicate comparativ cu purtătorii a cel puțin unui tip de alelă sălbatică (p=0,014), dar nu au existat modificări ale mARN sau ale expresiei proteice cel puțin în ceea ce priveşte polimorfismele studiate.

Rezumând, importanța funcțională a polimorfismului MDR1 rămâne încă să fie elucidată. Posibil dezechilibrul de linkaj dintre exonul 26 C3435T şi exonul 21 Ala893→Ser poate contribui la variațiile activității P-gp; cu toate acestea, nu există încă o explicație pentru asocierea dintre C3435T şi expresia P-gp aşa cum este descrisă în unele studii. Prin urmare se poate lansa o ipoteză că C3435T reprezintă un marker genetic pentru variante încă neidentificate situate la nivelul regiunii reglatoare a genei MDR1.

13.4. Concluzii

Adaptarea timpurie a schemelor terapeutice la trăsăturile genetice ar putea avea drept rezultat evitarea efectelor secundare şi îmbunătățirea rezultatelor clinice ale farmacoterapiei. Genotiparea în loc de fenotipare pentru medicamentele de testat este de preferat a se realiza în timpul unei farmacoterapii în desfăşurare, din moment ce unele medicamente pot inhiba, de exemplu, activitatea CYP2D6. Cel puțin majoritatea alelelor deficitare proprii diferitelor grupuri etnice, ar trebui caracterizate şi folosite în aprecierea fenotipului sau genotipului. Beneficiul adaptării dozelor conform genotipului este cel mai bine descris de studiile realizate pe medicația antipsihotică; cu toate acestea, există încă o mare nevoie de studii prospective care să genereze dovezi certe. Dozele inițiale recomandate, dependente de trăsăturile farmacogenetice, au fost publicate pentru toate medicamentele antidepresive de Kirchheiner şi colab.,(2001). Acesta a reprezentat un pas major în încercarea de a îmbunătăți terapia medicamentoasă individuală, însă este nevoie de studii clinice mult mai standardizate, care să testeze eficacitatea şi efectele secundare genotipic adaptate şi nonadaptate ale diferitelor scheme terapeutice.

CAPITOLUL 14

TOXICOGENOMICA: INTEGRAREA NOILOR METODE PROPRII BIOLOGIEI MOLECULARE ÎN TOXICOLOGIE

14.1. Dezvoltarea toxicologiei

Efectele toxice produse aupra unui organism şi induse de substanțele din mediu au fost studiate ani la rând. Inițial toxicologii au luat în considerare în studiile lor, morfologia şi fiziologia organismului, incluzând determinarea dozelor de substanțe, potențial letale, greutatea corpului şi a organelor şi inclusiv patologia brută. Dezvoltarea tehnicilor histopatologice a permis examinarea microscopică a țesuturilor şi determinarea efectelor toxice la nivel celular. În anii 1980, tehnicile moleculare au devenit accesibile constituind modalități de identificare precoce şi cu o înaltă sensibilitate a punctelor moleculare afectate şi a evidențiat deosebirile existente între diferitele tipuri de toxicitate. Aceste tehnici au avut drept rezultat scurtarea timpului dintre administrarea medicamentului şi detectarea efectelor sale, adică a timpului de expunere. Acum sunt frecvent cercetate modificările legate de nivelul anumitor proteine sau metaboliți tisulari, din sânge sau urină, în strânsă corelație cu tipuri specifice de toxicitate.

Majoritatea parametrilor chimici convenționali, specifici analizelor clinice, au fost stabiliți empiric. Ei sunt rezultatul proceselor celulare aberante, în mai mare măsură decât componentelor mecanismului toxic. Spre exemplu pasajul enzimelor la nivelul membranelor lezate este un proces secundar unei faze târzii a apoptozei celulare. Determinarea punctelor lezate având la bază o singură moleculă pot să-şi găsească aplicabilitate dacă există noțiuni prestabilite asupra modului de acțiune al agentului aflat în studiu. Prin urmare aceste experimente primare pot contribui la confirmarea ipotezei. Cercetătorii îşi propun să descopere markeri specifici ai

toxicității care pot fi găsiți la nivelul modificărilor nivelelor de expresie genică, proteică şi a metaboliților care determină răspunsul celular la o injurie provenită din mediul intracelular. Ca urmare a eforturilor de elucidare a secvențelor genomice majore, tehnologii funcționale genomic au fost elaborate ca să înarmeze toxicologii cu noi posibilități de studiu ale toxicității în organism, la nivel molecular printr-o abordare celulară de anvergură. Teoretic toate biomoleculele celulare pot fi azi determinate concomitent. Toxicogenomica, prin urmare, este definită ca domeniu de aplicare a tehnologiilor funcționale genomice în toxicologie. În cadrul acestei definiții, toxicogenomica integrează genomica funcțională cu metode toxicologice convenționale. Figura 14.1 prezintă dezvoltarea toxicologiei de la începuturile ei până în era toxicogenomicii.

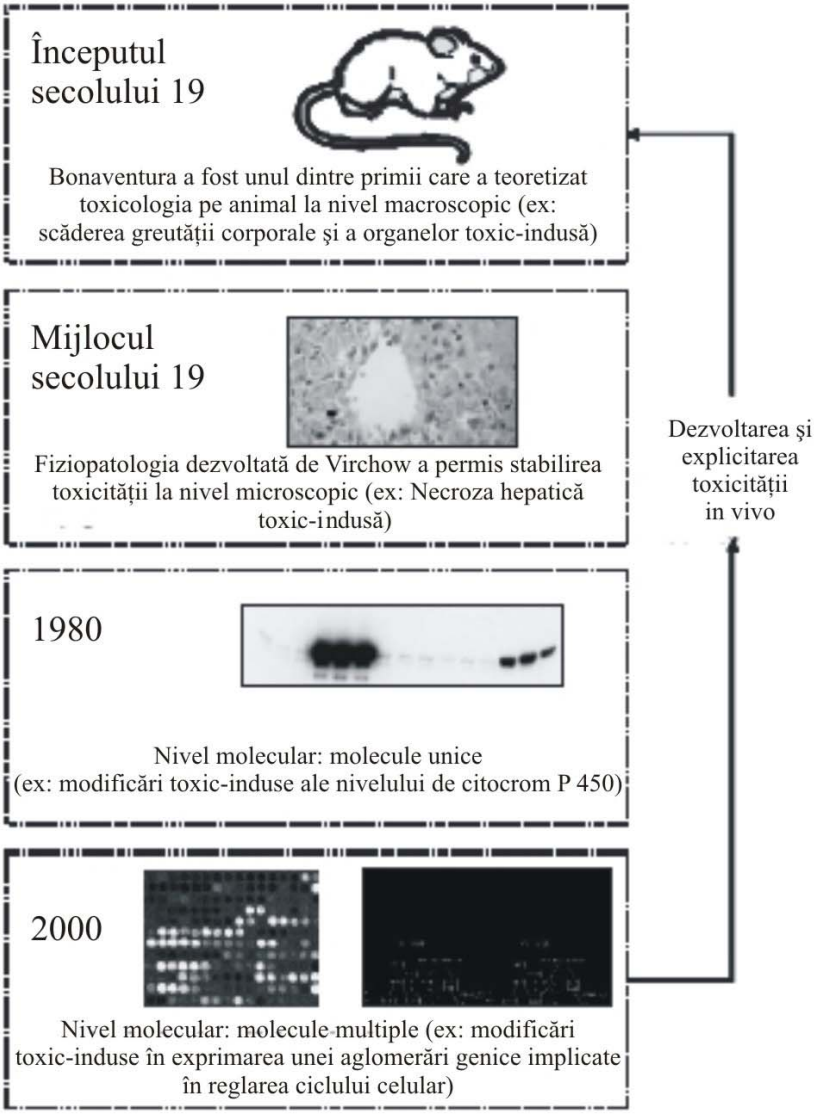


Fig.14.1. Istoricul evoluției toxicologiei

În acest capitol, mai întâi, vom trece în revistă diferitele tehnologii genomice funcționale şi apoi vom discuta despre aplicabilitatea lor în studiile toxicologice. Toxicogenomica are potențialul de a îmbunătăți aprecierea efectelor compoziției genomice asupra rezultatelor toxicologice, oferind o mai bună înțelegere a mecanismelor toxicității; ea va facilita evaluarea toxicității compuşilor necunoscuți, va ajuta la producerea unor markeri induşi de mecanismul toxicologic, va îmbunătăți corespondența toxicologică între specii şi extrapolările *in vitro-in vivo*, şi nu în cele din urmă va facilita dezvoltarea unor subdiscipline toxicologice care se vor ocupa de mixturile chimice.

14.2. Genomica funcțională: noi tehnologii ale biologiei moleculare

Tehnologiile genomice funcționale măsoară răspunsurile moleculare, dintr-un organism într-o manieră extinsă din punct de vedere celular. Informațiile disponibile în ceea ce priveşte secvențele genomice, proteinele celulare şi conținutul în metaboliți, sunt utilizate pentru a deduce rolul funcțional al mecanismelor şi căilor celulare ale diferitelor molecule. Genomica este aria de cercetare care studiază genomul prin intrermediul studiului secvențelor nucleotidice, structura genomică şi compoziția sa. Studiul transcripției, proteomica şi determinarea metaboliților duc la aflarea nivelurilor de expresie ale transcripției genice, proteinelor şi respectiv metaboliților.

14.2.1. Genomica

O multitudine de oportunități au fost oferite biologiei şi stiințelor care se ocupă cu studiul vieții de către dezvoltarea proiectelor de secvenționare genomică, precum şi eforturilor întreprinse în scopul determinării secvențelor genoamelor altor specii cum ar fi şobolanul sau maimuța. Acizii nucleici sunt depozitarii informației genetice, care reprezintă informația de bază necesară producției proteinelor celulare.

Înțelegerea acestei informații genetice de bază reprezintă un pas important pentru elucidarea mecanismelor moleculare care au loc la nivelul acestor proteine.

Mai mult, detaliile asupra organizării cromozomiale a genelor şi a elementelor reglatoare transcripţionale, contribuie la elucidarea funcţiei genice şi rolul acesteia în procese specifice. Comparaţii între genomul complet al diferitelor organisme facilitează identificarea originii moleculare care determină mecanismele celulare, comune sau specifice şi de asemenea proprietăţile fiziologice ale diferitelor specii.

Un alt nivel în cadrul cercetărilor genomice îl reprezintă identificarea micilor modificări proprii genoamelor individuale, polimorfismele uni-nucleotidice (SNPs), care sunt responsabile pentru multe diferenţe interindividuale şi implicit pentru o mare gamă de boli genetice. Diferenţele interindividuale care se evidenţiază prin intermediul SNPs la nivelul genelor specifice sunt de mare importanţă în cercetările toxicologice. Dacă gena ce codifică o enzimă care metabolizează un medicament, este uşor diferită, activitatea catabolizatoare a enzimei corespondente ar putea suferi modificări. Rata de activare şi metabolizare a unui xenobiotic şi mecanismele de protecţie stabilesc, în ce măsură, toxicitatea se manifestă în organism.

14.2.2. Transcriptomica

Majoritatea proceselor celulare sunt controlate la nivelul expresiei genice. Determinarea exprimării genetice prin estimări ale nivelurilor ARNm, s-a dovedit importantă pentru evaluarea sintezelor proteice şi implicit a activităţii proteice (activitatea enzimatică totală care acţionează asupra unui substrat), cel puţin pentru anumite clase de enzime. În mod tradiţional concentraţiile de ARNm au fost determinate utilizând tehnici Northern blot cu nucleotide radiomarcate. Determinarea ARNm specific, extrem de sensibilă calitativ, a fost posibilă odată cu dezvoltarea revers transcrierii şi a reacţiei de polimerizare în lanţ (RT-PCR). O metodă adaptată principiului de mai sus (RT-PCR) a fost de asemenea folosită pentru a cuantifica modificările în ceea ce priveşte cantitatea de ARNm comparativ cu o genă cu expresie constitutivă („housekeeping”). Din moment ce aceste tehnici sunt extrem de laborioase şi nu sunt potrivite pentru obţinerea de rezultate pretabile standardizării, determinarea simultană a nivelurilor de expresie a multor gene nu este realizabilă. Analiza seriată a expresiei genelor (SAGE) este o metodă care este corelată cu

determinarea secvențelor de ARNm specific, prezent în cadrul unei populații randomizate de ARNm izolat dintr-o celulă. Recent decelarea microstucturilor care au la bază ADNc şi oligonucleotide, au fost realizate pe scară largă ca metode de expresie genică, măsurători care beneficiază de disponibilitatea unor colecții de fragmente genice cu dispunere cunoscută a secvențelor şi adesea cu adnotarea funcției lor la nivelul celulei. Pe lângă acestea, microstructurile pot fi generate de la nivelul colecțiilor de secvențe exprimate ale markerilor (EST)-ADNc derivate din moleculele de ARNm pentru cele mai multe dintre ele funcțiile fiind încă supuse determinării. În tehnica Northen blot, capacitatea ADN-ului şi ARN-ului unicatenar de a hibridiza specific catena complementară, este utilizată pentru determinarea nivelului de ARNm al genei de studiat. Cu toate acestea, în loc de o singură genă, moleculele de ADNc unicatenare, pentru mii de gene, sunt depozitate la nivelul unui punct fix de pe suprafață (spre exemplu, lamă de sticlă, plastic, membrană de nailon), denumită microstructură ADNc sau cip de ADN. Prin hibridizarea microstructurii ADNc într-o baie de ARNm izolați, fiecare ARNm specific va fi hibridizat doar cu ADNc, la nivelul punctului care conține ADN-ul complementar pentru fiecare genă specifică în parte. Cantitatea de ADNc hibridizat în fiecare punct poate fi detectată prin măsurarea fluorescenței, încorporată în această mostră. O privire de ansamblu asupra evaluărilor nivelurilor de ARNm bazate pe procesul care cuprinde ADNc şi microstucturi, este prezentată în figura 14.2. În practică, 2 probe sunt întodeauna hibridizate împreună pe microfragmentul ADNc, unde una dintre probe este marcată cu un anumit tip de fluorofor (exemplu, fluorescență verde) şi altă probă de referință sau control este marcată cu un alt tip de fluorofor (exemplu, fluorescență roşie). Cuantificarea ambelor tipuri de fluorescență permite determinarea unei rate de expresie pentru fiecare genă, din proba de cercetat comparativ cu proba de control. În timp ce o mare parte din miile de gene măsurate nu vor prezenta modificări ale nivelurilor de expresie, când probele provenite de la bolnavi sau tratați sunt comparate cu cele de control, genele găsite ca induse sau reprimate aduc o multitudine de informații asupra mecanismelor celulare care sunt afectate la nivelul expresiei genice de către boală sau din contră de către acțiunea terapiei

medicamentoase. DeRisi şi colab,(1997) prezintă detalii mai amănunţite asupra tehnologiilor care folosesc microstructurile ADNc.

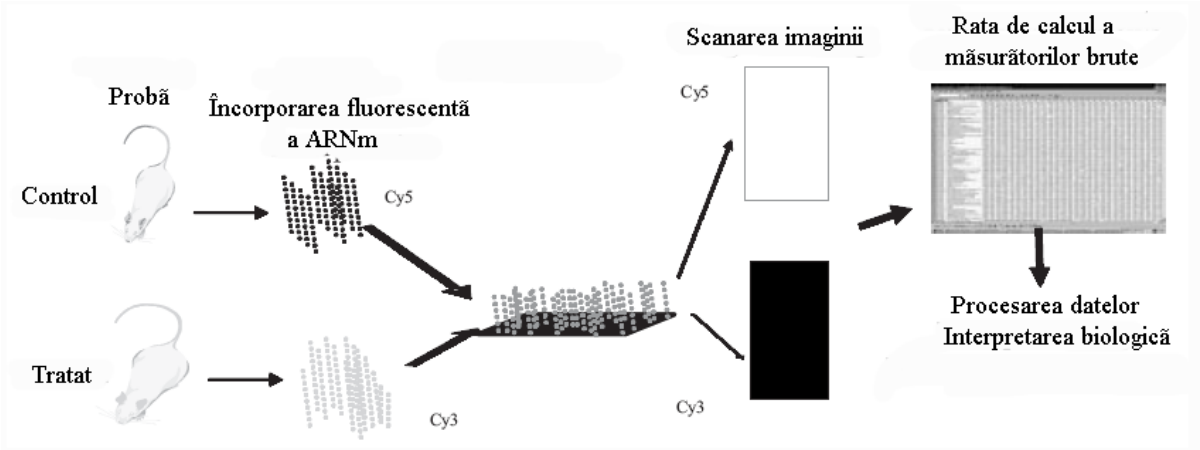


Fig.14.2. Măsurători transcriptomice bazate pe microstructurile de ADNc. ARNm extras din fragmente tisulare este marcat fluorescent şi hibridizat la o microstructură ADNc, care conţine mii de molecule ADNc diferite în poziţii fixate. Scanarea microfragmentelor are drept rezultat două imagi care sunt cuantificate şi utilizate pentru a calcula expresia relativă a genelor la nivelul unui ţesut comparativ cu fragmentul tisular de control.

14.2.3. Proteomica

Nu toate mecanismele celulare pot fi măsurate în ceea ce priveşte nivelul de ARNm. Modificarea rapidă a redistribuirii subcelulare a proteinelor deja prezente la nivelul celulei, ar putea fi necesară, în special în ceea ce priveşte mecanismele protectoare de răspuns celular . Tehnologiile de analiză proteică ar putea permite o vizualizare mai bună a proceselor care nu implică biosinteze active, sau cel puţin, vor putea fi complementare analizei de expresie genică. Termenul de „proteom” este utilizat pentru a nota întreaga populaţia completă de proteine exprimate într-o celulă. Pe lângă transcriptomică, tehnologiile proprii proteomicii pot fi aplicate pentru măsurarea simultană a miilor de proteine dintr-o celulă. Din moment ce proteinele acţionează cu precădere în reacţiile celulare mai degrabă decât în transcripţia genică, proteomica se va dovedi a fi mai importantă decât determinările transcriptomice. Determinarea proteomului este mai complexă decât transcriptomica, unde populaţia totală de ARNm poate fi izolată deodată şi, relativ uşor, miile de elemente de transcripţie care diferă doar în secvenţa nucleotidică, sunt sortate în procesul hibridizării microfragmentelor ADNc. În contrast, separarea tuturor proteinelor

diferite dintr-o celulă reprezintă o sarcină extrem de complicată, deoarece proteinele au proprietăți diferite (masă, punct izoelectric (pI), solubilitate, stabilitate, etc.). Modificările posttranslaționale şi capacitatea de a forma complexe proteice nu pot fi trecute cu vederea în abordarea proteomicii. Variate metode au fost dezvoltate în cercetarea proteomică.

Prima generație de metode proteomice combină tehnicile, relativ vechi, de electroforeză bidimensională în gel de agaroză cu dezvoltarea tehnicilor puternic automatizate de analiză software, evoluează către spectrometria de masă şi schimbul global de informații care are la bază Internetul. Cantitatea totală de proteine dintr-o probă este mai întâi separată pe baza punctului izoelectric al proteinelor, folosind o lamă cu un gradient de pH imobil ataşat. Gradiente diferite de pH pot fi alese pentru a obține o clasificare exactă a elementelor de interes. După axarea pe activitatea izoelectrică, proteinele sunt transferate pe un gel de poliacrilamină, şi având la bază masa proteică se efectuează separarea prin gel electroforeza standard. Proteinele separate sunt apoi vizualizate folosind marcarea fluorescentă sau cu argint. Gelurile sunt scanate, imaginile sunt analizate cu tehnologii de software specifice şi volumele cuantificate.

Drept exemplu, imaginile gel caracteristice reprezintă modele proteice obținute atât din ficat provenind de la şobolani de control dar şi de la cei expuşi la hepatotoxicul, bromobenzen (fig.14.3). Consecutiv, din gel se pot izola puncte de interes, ulterior purificate şi anlizate prin mijloace de spectrometrie de masă. Proteinele pot fi identificate după o fragmentare specifică (spre exemplu, digestia cu tripsina), care generează fragmente peptidice cu o masă extrem de specifică determinată prin tehnica ionizării prin desorbție de matrice cu ajutorul laserului şi calculul masei prin măsurarea timpului de zbor (MALDI-TOF-MS). Modelul de fragmentare este apoi utilizat pentru identificarea proteinei care corespunde acestui model dintr-o bază de date în care sunt introduse modele fragmentare prestabilite ale tuturor secvențelor proteice cunoscute.

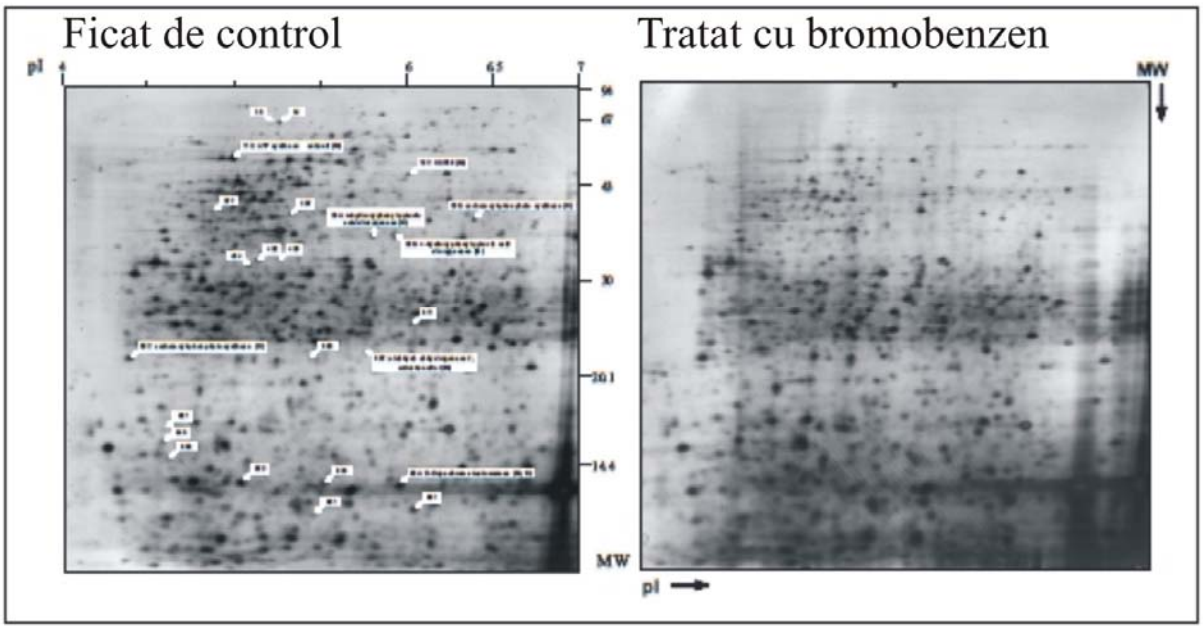


Fig.14.3. Imagini de gel electroforeză bidimensionale ale măsurătorilor proteomice. Este prezentată compoziția proteică a ficatului de şobolan fără (imaginea 1) şi cu (imaginea 2) tratament cu bromobenzen.

De asemenea, secvenționarea peptidică poate fi realizată prin tehnicile MS/MS pentru a confirma, şi mai mult, identitatea proteică. În lipsa izolării din gel (tehnică practicată actual) punctele proteice pot fi identificate funcțional pe baza unei asemănări cu o altă proteină identificată anterior în exact aceeaşi poziție, într-un gel de referință.

O altă metodă proteomică, aflată încă în cercetare, este reprezentată de aplicarea microregiunilor proteice într-o manieră comparabilă cu cea a microfragmentelor ADNc din transcriptomică. Proteinele sau anticorpii antiproteine sunt decelați pe o suprafață solidă şi utilizați pentru a lega specific proteinele marcate la o probă. Un mare dezavantaj al acestei tehnici în comparație cu microfragmentele ADNc o constituie variația afinității de legare printre proteine. Condiții optimizate de legare pot fi aplicate doar pentru o parte din proteine, iar legarea în condiții suboptime va genera rezultate părtinitoare. Recent, s-au dezvoltat metode care aplică aceste diferențe de afinitate de legare pentru a sorta proteinele în funcție de acestea. Acest fapt permite separarea proteinelor bazată doar pe câteva proprietăți caracteristice, însă nu separă toate proteinele din mixtura izolată dintr-o celulă.

Diferiţi produşi chimici de suprafaţă sunt utilizaţi pentru a atrage proteinele în regiuni în care apoi vor fi direct analizate prin spectrometrie de masă. Ca exemplu oferim tehnica ICAT®, care oferă o dispoziţie diferită a două probe proteice, folosindu-se de cromatografia lichidă-MS/MS cu markeri de afinitate codificaţi izotopic, şi SELDI (desorbţia/ionizarea de suprafaţă laser dependentă).

14.2.4. Metabolomica

Derularea proceselor celulare este adesea reflectată de către nivelurile de metaboliţi care pot fi determinate atât în celulă cât şi în fluidele extracelulare. Reacţiile biochimice din celulă pot fi studiate, în timpul şi după, desfăşurarea lor prin monitorizarea apariţiei respectiv dispariţiei produşilor de reacţie. Dinamica proceselor celulare poate fi monitorizată utilizând profilul metaboliţilor. Procese precum metabolizarea şi biotransformarea xenobioticelor, pot fi urmărite, şi de asemenea clerance-ul metaboliţilor poate fi determinat în urină. Un alt avantaj important îl reprezintă faptul că, metodele noninvazive pot fi folosite pentru colectarea de probe de sânge (plasmă), urină sau alte fluide corporale. Acestea cresc cu mult aplicabilitatea atât în experimentele animale cât şi în cele efectuate pe om. Recent, analiza RMN a fost de asemenea realizată pe ţesuturi şi celule.

Tehnicile de spectometrie de masă (gaz cromatografia/MS) permit determinarea unor concentraţii scăzute ale componentelor individuale. Pentru un screening global spectroscopia H^1-RMN reprezintă o abordare atractivă, deoarece o mare varietate de metaboliţi poate fi cuantificată concomitent fără a fi necesară prepararea de probe costisitoare. Este obţinut un spectru cu vârfuri de rezonanţă caracteristice pentru toate biomoleculele de mică dimensiune. În acest mod este obţinută o amprentă metabolică caracteristică fluidului biologic aflat în studiu. Semnalele individuale pot fi cuantificate şi identificate în spectru pe baza unui spectru de referinţă disponibil. Spectrul RMN al fluidelor biologice este foarte complex datorită mixturii de numeroşi metaboliţi prezenţi în aceste fluide. Variaţiile între probe sunt adesea prea reduse pentru a fi recunoscute cu ochiul liber.

Cu scopul de a îmbunătăți gradul de comparabilitate al spectrului RMN, şi prin urmare de a maximiza certitudinea analizei consecutive a datelor, un algoritm liniar parțial ajustează micile modificări din spectru şi menține totodată rezoluția. Pentru a descoperi diferențe semnificative este necesară o analiză a datelor multivariată pentru a explora modelele recurente dintr-un număr de spectre RMN. Un factor de spectru este utilizat pentru a identifica vârfurile RMN ale metaboliților care diferă în urina unui subiect supus terapiei comparativ cu un subiect de control (fig.14.4).

Corelațiile dintre elementele variabile din complex şi multitudinea de date (mii de semnale în spectru) sunt relaționate cu o țintă variabilă cum este statusul toxic. Combinația profilului MS cu analiza multivariată a datelor oferă o metodologie de amprentare puternică.

O alăturare a tehnicilor analitice este de dorit pentru o analiză completă a unei mixturi complexe de metaboliți [Robertson, Orrenius , 2000; Holmes şi colab., 2001].

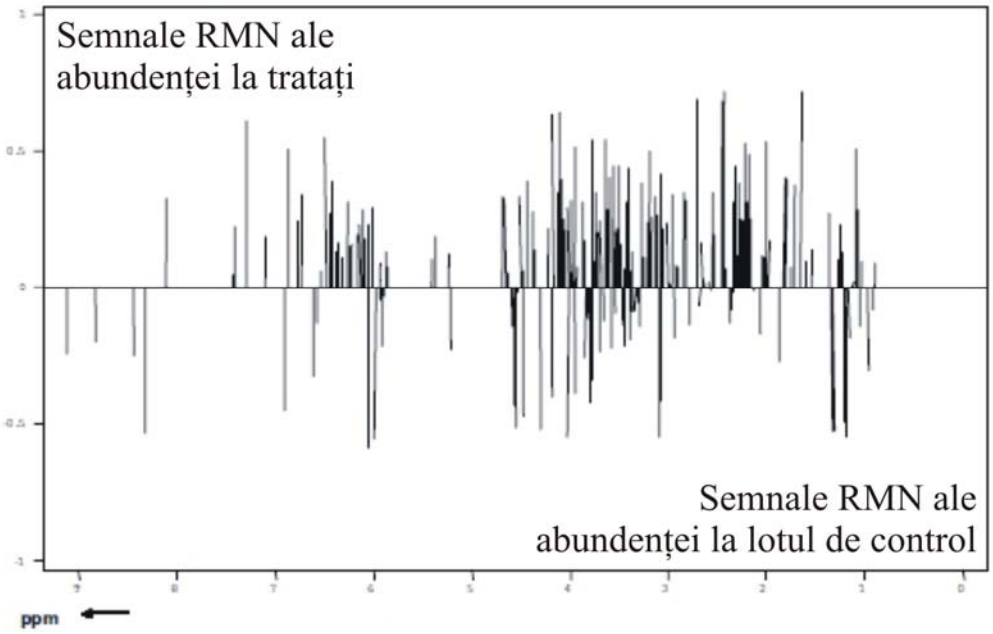


Fig.14.4 Amprenta metabolică. Acest factor de spectru vizualizează diferențele dintre modelele RMN ale urinii de şobolan cu şi fără tratament toxic inductor. Vârfurile reprezintă metaboliții care diferă în conținut între cele două probe.

14.2.5. Procesarea datelor şi bioinformatica

Manevrarea datelor obținute în urma experimentelor desfăşurate la scară mare necesită echipamente de procesare a datelor şi algoritmi. Informatica de laborator care descrie condițiile experimentale ar trebui înmagazinată şi păstrată imediat [spre exemplu, Sistemul de Management al Informaticii de Laborator(LIMS)] şi organizată într-o manieră care să permită accesul facil. Rezultatele experimentale ar trebui corelate cu informațiile experimentale şi dipuse într-o manieră organizată folosind o aplicație a computerului denumită depozit de date (data warehouse). Procesarea datelor include corecții (în majoritate tehnice) ale factorilor care influențează datele, dar nu reprezintă condițiile supuse studiului. Filtrarea măsurătorilor incerte este esențială pentru îmbunătățirea bazei de date. Cuantificarea raportului semnal per zgomot (signal to noise) şi aplicarea unor limite mai scăzute ar putea conduce la excluderea semnalelor slabe din interpretările ulterioare. Deviații specifice introduse în baza de date spre exemplu, datorate eficienței fluorescenței încorporate, sunt corectate folosind proceduri normalizatoare. Procesarea greoaie a datelor depinde de utilizarea atât a aprecierilor despre originea tehnică cât şi biologică.

În transcriptomică, se presupune frecvent, că majoritatea dintre miile de gene nu-şi schimbă nivelul de expresie în urma modificărilor (modeste) apărute în condiții experimentale. Standardizarea, normalizarea sau gradarea sunt metode aplicate pentru a transforma bazele de date în forme apte de a fi comparate între ele în ceea ce priveşte măsurătorile interne şi cele provenite din surse externe. Deviațiile sistematice care derivă din variate surse tehnologice ar trebui corectate. După procesarea brută a datelor, sunt obținute fişiere secundare care ar trebui salvate alături de cele care descriu metodele de analiză a datelor.

O nouă provocare pentru cercetarea biomedicală o constiutie transformarea bazelor mari de date, cu cantități mari de zgomot şi fără o însemnătate biologică evidentă în descoperiri relevante, care să includă selecția unor subseturi dintre miile de gene, proteine sau metaboliți care să aibă caracteristici biologice relevante. Acele subseturi vor putea fi supuse unor cercetări ulterioare elaborate. Tehnici matematice sunt aplicate pentru a aglomera datele în grupuri interpretabile sau modele structurate.

Metodele aplicate în acest scop, algoritmi de agregare asemenea agregării ierarhice (fig.14.5), metoda de clusterizare folosind media (K-mean) şi hărţi cu auto-organizare, apreciază gradul de similaritate dintre profilele de expresie ale genelor.

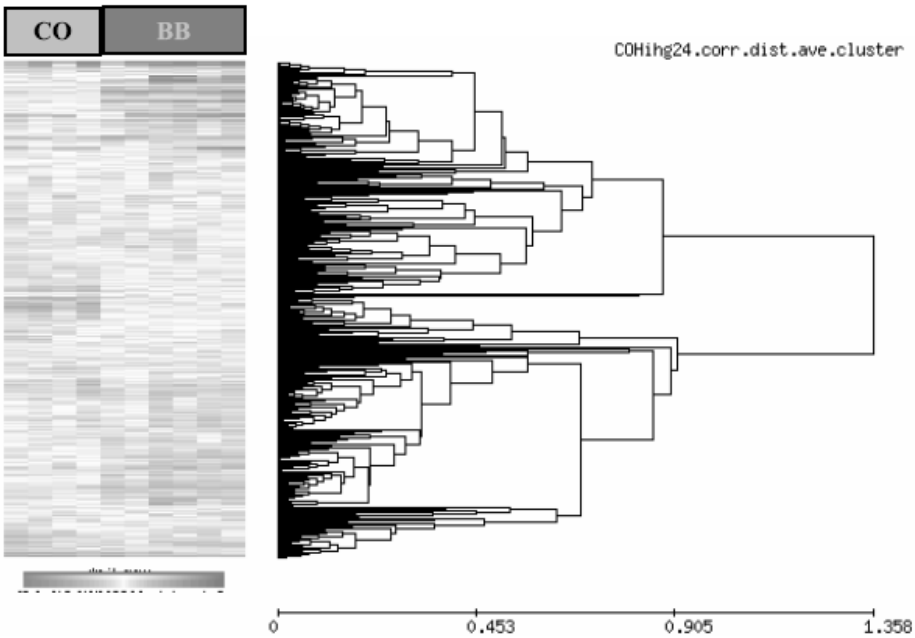


Fig.14.5. Dendrograma agregatelor ierarhice ale datelor transcriptomice provenind din observarea ficatului şobolanilor netrataţi, de control-la care s-a administrat ulei de porumb (CO) şi şobolanii trataţi intens cu bromobenzen (BB). Genele sunt ierarhizate orizontal, în timp ce coloanele, reprezintă fiecare o probă diferită. Intensităţile diferite ale culorii gri corespund nivelurilor de expresie genice crescute şi respectiv scăzute.

Agregatele reprezintă dispuneri ale genelor care se comportă mai asemănător între ele comparativ cu genele provenind din afara aglomerării. Numărul de agregate formate poate fi introdus în baza de date sau poate fi determinat automat prin utilizarea algoritmilor de agregare. Odată ce subtipurile au fost decelate acestea sunt analizate în ceea ce priveşte modificările induse de condiţiile de mediu, iar moleculele din aceste subtipuri sunt mai departe analizate în ceea ce priveşte relevanţa lor biologică. Alte metode asemenea analizei componentelor principale (PCA) determină structura intrinsecă din interiorul bazei de date, fără cunoştinţe anterioare.

Beneficiind de asemenea metode o comparaţie directă între bazele de date este realizată iar subbaze de date sunt obţinute doar pe baza similarităţii spectrelor RMN. Metodele supervizate asemenea analizei pătratelor parţiale (PLS) şi analizei discriminante a componenţilor majori sunt mijloace mult mai eficiente, care folosesc

informație adițională în baza de date precum date biochimice, histopatologice sau clinice pentru a identifica diferențele dintre grupurile predefinite. Pentru o detaliere a diferitelor metode de analiză a datelor din genomica funcțională vă recomandăm să citiți Brazma, Vilo , (2000); Fielden şi colab., (2002).

14.2.6. Interpretarea biologică

Nu este posibil să analizăm datele de expresie una câte una, pentru o singură genă sau bază proteică deoarece aceasta ar determina pierderea unei cantități mari de informații care rezultă din coerența datelor colectate în urma unui studiu. Relația dintre genele şi proteinele exprimate în anumite situații, luând în considerare timpul, localizarea şi condițiile experimentale sunt cele mai valoroase informații care se pot obține prin studiile genomice funcționale. Determinarea nivelului de expresie genică, proteine sau metaboliți nu este suficientă pentru a căpăta un profil biologic intern complet al celulei. Studierea interacțiunii şi integrării diferitelor entități biologice este de mare importanță în descifrarea mecanismelor celulare. Descoperind interacțiunile intracelulare, proprii unei celule, poate fi realizat în consecință un model complex, dinamic al căilor celulare. Modificările observate la nivel celular/molecular devin biologic relevante doar dacă se reflectă asupra fiziologiei organismului. Funcționalitatea este asumată odată cu interpretarea modificărilor care apar la nivelul exprimării; cu toate acestea, la final, această funcționalitate trebuie determinată şi la nivel fiziologic.

Privind efectele (asupra fiziologiei) ale anumitor boli genetice, cercetătorii pot privi din interior fenomenul funcționalității genelor care sunt afectate. Spre exemplu, mutația unei gene poate avea efecte asupra componentelor din aval, dintr-un mecanism celular, reglat de către gena care a suferit mutația. O altă abordare o constituie examinarea funcției fiecărei gene, una câte una, cu ajutorul deleției unei gene, realizând aşa numitele lanțuri knockout ale organismului. O mare varietate de aspecte fiziologice şi comportamentale sunt monitorizare fără elaborarea unei ipoteze *a priori*.

Teoria conform căreia cunoaşterea funcției unor gene individuale ar fi suficientă pentru înțelegerea mecanismelor complete pe care le presupun aceste gene, este încă discutabilă.Tehnologiile genomice funcționale sunt concepute ca tehnologii la scară largă de mare capacitate. În consecință s-au obținut cantități mari de informații (tabelul 4.1), deşi cu un nivel tipic, oarecum scăzut, de încredere din punct de vedere cantitativ şi comparativ cu determinările realizate la nivelul unei singure gene sau proteine. Cu toate acestea, tehnologiile de care vorbeam şi-au dovedit din plin utilitatea în ceea ce priveşte monitorizarea holistică a efectelor, aflarea unor rezultate surprinzătoare şi generarea de ipoteze şi mecanisme de acțiune. Însă, descoperirile majore despre modificările biomoleculelor specifice sau proceselor rămân de confirmat şi investigat, mai mult cu ajutorul unor metode specifice. Aceste fapte necesită de asemenea implicarea unor experți cercetători din domenii de cercetare specifice, a unei expertize elaborate şi implicit a unui echipament complex. Tehnici cum este RT-PCR cantitativă şi Northern blot sunt utile pentru validarea tehnică, dar asemenea microregiunilor ADNc, determină niveluri ale ARNm care au doar valoare predictivă. Tehnica Western blot şi tehnicile imunologice (ELISA) pot fi utilizate pentru a confirma prezența nivelurilor de proteine în mostre, având o acuratețe mai mare decât tehnologiile proteomice bidimensionale bazate pe gel, cel puțin aunci când ne referim la nivelul de proteine totale. Un dezavantaj al determinărilor unice de genă sau proteină este reprezentat de pierderea de informație din parametrii circumstanțiali, precum genele care sunt în relație de interdependență cu cea studiată. În cel mai bun caz, sunt determinate nivelurile a cel puțin una sau două proteine adiționale de referință în plus, iar aceste determinări se realizează sub premiza că acestea nu se modifică în condițiile experimentale (aşa numitele proteine „housekeeping”). Cu toate acestea genele şi proteinele chiar dacă se apreciază că sunt prezente la un nivel constant, indiferent de condiții, de fapt prezintă variații ale expresiei în anumite circumstanțe. Determinarea în sine a nivelului proteic nu oferă probe pentru implicarea efectivă a proteinelor în mecanismele celulare.

Teste specifice pentru activitatea enzimatică ne oferă o confirmare în plus ce determină capacitatea funcțională a proteinelor (enzimelor) din mostră. Mai mult,

nivelul de metaboliți oferă informații asupra reacțiilor biochimice care au avut deja loc. Cea mai relevantă confirmare biologică a modificărilor o reprezintă relaționarea lor cu efectele fiziologice. Doar la acest nivel modificările au relevanță şi prezintă consecințe asupra organismului. Modificările expresiei genice şi proteice sau ale conținutului în metaboliți pot fi desemnate drept efecte adverse după corelarea cu efectele fiziologice cunoscute ca însoțind stările toxice.

Tabelul 14.1 Referințe privind genele şi tehnologiile genomice

Swissprot	http://us.expasy.org/
Institutul European de Bioinformatică (EBI)	http://www.ebi.ac.uk/
Profilare a expresiei la EBI	http://ep.ebi.ac.uk/EP/EPCLUST
NCBI's Unigene, GenBank, OMIM, etc.	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
GeneCards	http://bioinfo.wiezmann.ac.il/cards/
Hărți genetice KEGG	http://www.genome.ad.jp/kegg/
Hărți genetice Biocarta	http://www.biocarta.com/genes/index.asp

14.3. Integrarea tehnologiilor genomice funcționale în toxicologie

Toxicologia poate fi definită drept distorsionarea proceselor biologice dintr-un organism, organ sau celulă. Mii de expresii ale genelor sau proteinelor şi diferite niveluri de metaboliți, dintr-o mostră, caracterizează statusul specific al probei în cauză. Prin urmare, prin investigarea mecanismelor celulare/moleculare proprii unei celule, tehnologiile genomice funcționale pot fi de reală valoare în toxicologie precum şi în alte ştiințe care se ocupă de studiul vieții. Profilele expresiei genice, spre exemplu, pot fi folosite la descoperirea mostrelor expuse la diferite clase de substanțe toxice, pot prezice toxicitatea unor compuşi necunoscuți şi pot contribui la studiul mecanismelor celulare ce pot determina efecte toxice, sau pot deriva din efectele toxice. În schimb, transcriptomica, reprezintă un mecanism foarte bun pentru evaluarea răspunsurilor toxice [Bulera şi colab., 2001].

În subcapitolele ce urmează vor fi discutate aplicațiile majore ale tehnologiilor genomice funcționale care prezintă un potențial uriaş pentru îmbunătățirea ştiințele toxicologice.

14.3.1. Elucidarea mecanismelor

Interacțiunile dintre genele şi proteinele aflate la baza majorității proceselor biologice şi expresia coordonată a genelor sau proteinelor, în circumstanțe specifice, oferă o indicație asupra relației dintre molecule într-un mecanism biologic. Un mecanism toxic poate prin urmare să fie reconstruit la nivel molecular prin urmărirea modificărilor de la nivelul expresiei genice care interacționează sau se influențează reciproc. Cum mii de molecule sunt investigate simultan, şansa de a identifica molecula țintă care declanşează un efect toxic la interacțiunea cu xenobioticul, a crescut azi simțitor. Această moleculă țintă poate fi un receptor celular care inițiază un efect advers în celulă la ataşarea ligandului (xenobiotic). Experimentele transcriptomice se pot realiza cu scopul de a identifica organele sau organitele, dintr-un organism, care pot forma cel mai uşor situsurile țintă ale efectelor adverse, fără informații anterioare. Evaluarea multi-organică inițială poate ajuta la decelarea unor modificări caracteristice ale expresiei genice care pot indica organele ce ar trebui alese pentru studii ulterioare toxicologice amănunțite, limitând prin urmare numărul acestor studii extrem de laborioase.

14.3.2. Amprentarea transcriptomică şi aprecierea toxicității

O aplicație extrem de avantajoasă a toxicogenomicii poate fi reprezentată de recunoaşterea proprietăților toxice, în stadii incipiente, la candidații pentru screening medicamentos. Programele de producere a medicamentelor dezvoltă noi compuşi activi ca şi candidați pentru diverse terapii, la o rată extrem de crescută, folosind tehnologii precum chimia combinatorie. Mulți dintre miile de compuşi nou-sintetizați nu vor ajunge niciodată pe piață, în timp ce doar câțiva, vor fi selectați ca medicamente potențiale, şi vor fi evaluați într-un program extrem de elaborat, cu întindere mare în timp şi costuri ridicate, care să testeze eficacitatea şi toxicitatea. Alegerea pacienților pentru testarea medicamentelor pentru eventuale efecte toxice poate oferi un criteriu valoros pentru o selecție precoce. Determinarea profilelor expresiilor proteinelor sau genelor, realizate în urma expunerii compuşilor la diferite substanțe pot fi utilizate ,asemenea amprentării pentru a clasifica compuşii în funcție

de asemănare în ceea ce priveşte comportarea în urma expunerii la substanțe toxice cunoscute (model). Baze mari de date realizate cu informațiile obținute prin integrarea acestor profile expresionale, permit clasificarea modelului de expresie din mostra care prezintă interes toxicologic în ceea ce priveşte potența toxicului, tipul de mecanism, organele țintă, doza şi timpul de expunere.

Prin urmare un nou compus poate fi clasificat din punct de vedere toxic, în funcție de răspunsul transcripțional la substanțele toxice comune. Această aplicabilitate specifică a fost denumită toxicogenomică în anumite publicații, înglobând astfel un conținut mult mai restrâns.

14.3.3. Identificarea markerilor primari ai toxicității

Din moment ce modificările de expresie a mii de gene şi proteine sunt azi determinate, se aşteaptă identificarea de noi markeri genici sau proteici, specifici, care pot detecta sau chiar prezice anumite tipuri de toxicitate. Cu toate acestea, pentru a diferenția uşor diferitele tipuri de mecanisme moleculare care au condus la rezultate toxice similare, nu vor fi suficienți doar markerii de toxicitate specifici unei singure gene sau proteine. Probabil că niveluri de expresie uşor alterate ale multor gene determină mecanismul de toxicitate, necesitând măsurători precise şi pe scară largă a modelelor de expresie a mii de gene şi proteine.

Un model pluricelular al expresiei genice şi proteice, în analogie cu amprentarea, poate fi utilizat pentru a discerne o celulă sănătoasă de una aflată în diferite faze de distorisiune net diferită de una normală. Cunoaşterea profilului metabolitului aduce un avantaj în plus toxicologiei şi farmacologiei din moment ce toxicul (prin metaboliții săi) sau medicamentele pot fi detectate în plasmă sau urină şi permit aprecierea gradului de expunere sau pot confirma succesul terapiei.

14.3.4. Extrapolările realizate interspecii

Deşi sunt foarte diferite sub multe aspecte, animalele de laborator şi oamenii incluşi în trialurile clinice prezintă caracteristici extrem de similare la nivel molecular.

Majoritatea genelor identificate la oameni sunt de asemenea prezente la alte organisme precum şoarecii sau şobolanii.

Unele gene sunt identice la specii diferite, în timp ce genomul omului şi şobolanului prezintă o similaritate de peste 90%. Utilizând tehnicile de biologie moleculară sau toxicogenomică, similaritatea la nivel molecular se va dovedi un beneficiu mare în ceea ce priveşte extrapolarea rezultatelor. În timp ce răspunsurile fiziologice ar putea fi diferite, mecanismele moleculare evidențiate ar putea coincide într-o măsură foarte mare între diferitele specii.

14.3.5. Etrapolarea din experimentele *in vitro* la situațiile *in vivo*

În timp ce efectele toxicității asupra fiziologiei nu pot fi identificate *in vitro*, mecanismele moleculare care probabil conduc la apariția acestor efecte pot fi studiate prin intermediul acestor experimente. În funcție de sistemul model *in vitro* ales, procesele moleculare sunt mai mult sau mai puțin conservate. Adițional circumstanțele de realizare a experimentelor *in vitro* pot fi controlate şi monitorizate într-o manieră mai precisă decât cele *in vivo.*

14.3.6. Reducerea utilizării animalelor de laborator

Odată cu posibilitatea de a măsura parametrii celulari multiplii în detaliu, şansa de a observa detaliile toxicității este mult crescută. Refacerea multor măsurători ar putea fi necesară pentru a stabili, cât mai precis, modificările la nivelul unui marker empiric al toxicității. Este de aşteptat ca odată cu noile tehnologii ale biologiei moleculare, experimentul de generare a efectelor nu va mai trebui refăcut de atâtea ori, dacă sunt descifrate şi înțelese mecanismelor celulare.

Pe lângă acestea, toxicogenomica ne-ar putea ajuta la identificarea efectelor folosind modele alternative mai degrabă decât animale vii. Recunoaşterea precoce a toxicității scade utilizarea metodelor de laborator costisitoare şi de lungă durată. În special, atunci când evaluăm proprietățile carcinogenetice ale compuşilor, putem să preconizăm o ameliorare considerabilă.

14.3.7. Toxicologia combinatorie

Este de aşteptat ca efectele nocive să fie cauzate de mai mult de o singură substanță la nivelul amestecurilor complexe, cum sunt poluanții de mediu. O analiză corectă a toxicității acestor mixturi este azi greu realizabilă. Pentru a evalua efectele toxice însumate ale compuşilor, ar trebui realizate studii elaborate care să includă atât expunerea indivizilor la substanțe chimice unice dar şi la combinații. De cele mai multe ori markerii descriptivi empirici ai toxicității sunt monitorizați, dar discriminarea efectelor aditive şi sinergice în diferitele grupuri de tratament este limitată. Tehnologiile genomice funcționale permit monitorizarea a mii de efecte şi cresc probabilitatea de a găsi efecte diferite ale expunerii. Mecanismul efectelor combinate poate fi studiat şi/sau prezis la nivel molecular. Când molecule similare sau căi celulare se dovedesc a fi ținte ale diferitelor substanțe din mixtură, este de aşteptat să apară efecte sinergice sau aditive. Când modificările sunt povocate la nivelul diferitelor căi biologice, nu este de aşteptat intervenția directă a compuşilor de mixtură. Cu toate acestea, datorită complexității unui organism, efectele secundare ar putea influența alte mecanisme ale toxicității. Spre exemplu o depleție xenobiotic indusă a sistemului antioxidant de apărare intracelulară ar putea coborî valoarea prag de injurie din partea altor xenobiotice care au primar alte situsuri țintă.

În prezent, Heijne şi colab.,(2004) studiază efectele fiziologice ale expunerii combinate la aditivi alimentari, în combinație cu o abordare transcriptomică. Utilizarea aditivilor alimentari este autorizată în Uniunea Europeană cu condiția de a nu leza în nici un fel consumatorii. Consumarea aditivilor alimentari individuali este sigură în condițiile în care nu s-a observat nici un efect advers (NOAEL). Cu toate acestea normele NOAEL folosite pentru evaluarea riscurilor consumului acestor aditivi au adesea la bază ştiințe empirice, inclusiv chimia clinică şi patologia. Însă, sunt puține informații despre potențialele efecte asupra sănătății ale aditivilor consumați simultan sau diferit de normele NOAEL. Recent a fost efectuată o evaluare pentru a decela potențialele interacțiuni care au loc între peste 300 de aditivi alimentari aprobați [Groten şi colab., 2000]. Acțiuni posibil combinate nu au putut fi excluse pentru patru aditivi alimentari, care au ficatul drept organ țintă.

Pentru a evalua efectele create de o expunere joasă la mixturile toxice, şobolanii au fost expuşi timp de 28 de zile la concentraţii scăzute de aditivi alimentari selectaţi, care cauzează efecte hepatice (inducţia enzimelor cu rol în metabolizarea medicamentelor şi hepatomegalie) la concentraţii mai mari însă decât cele utilizate în studiul făcut de Heijne şi colab.,(2004). Efectele asupra ficatului induse de aditivii alimentari sunt destul de subtile şi de aceea au fost explorate modificările ce au loc la nivelul expresiei genice. Experimentele transcriptomice pentru patru compuşi au oferit o multitudine de informaţii biologice, incluzând schimbări ale enzimelor cu rol de metabolizare a medicamentelor, proliferarea peroxozimilor şi alterarea căilor metabolice ADN dependente. Menţionăm că descoperirile transcriptomice au putut fi confirmate la nivel biochimic. Rezultatele vor fi folosite la evaluarea interacţiunilor expunerii combinate la aceşti aditivi alimentari.

Prin urmare, aplicabilitatea mecanismelor de producţie toxicogenomice se va realiza la nivel molecular acolo unde nu s-a putut face identificarea cu ajutorul tehnicilor convenţionale. Studii ale unor mixturi ale acestor aditivi alimentari se află în desfăşurare şi vor fi utilizate pentru a evalua ipotezele formulate în urma studiilor pe compuşi unici.

14.4. Aplicaţiile toxicogenomicii în studiul mecanismului hepatotoxicităţii indusă de bromobenzen

Toxicitatea hepatică este azi monitorizată de rutină cu ajutorul unei largi game de parametrii determinaţi empiric. Modificările de greutate hepatică şi observaţiile patologice, cum sunt culoarea sau textura tisulară sunt indicatori nonspecifici ai toxicităţii. Toxicitatea hepatică specifică cum este necroza, hipertrofia, colestaza, steatoza, hepatita şi hiperplazia implică modificări celulare mai specifice la nivel celular şi molecular. Atunci când apare necroza, hepatocitele se rup iar distrucţia membranară conduce la scurgerea enzimelor intarcelulare în fluidele extracelulare. Fosfataza alcalină, lactat dehidrogenaza şi aminotransferazele sunt enzime utilizate adesea ca indicatori ai necrozei hepatice. Valoarea tehnologiilor funcţionale genomice reflectată asupra toxicologiei este ilustrată printr-un studiu care

demonstrează hepatotoxicitatea bromobenzen indusă la şobolani [Heijne şi colab., 2003]. Scopul studiului a fost acela de a elucida mai bine, mecanismul toxicității şi de a identifica proteinele şi genele, markeri specifici ai hepatotoxicității. Toxicitatea acută hepatică (24h) a fost indusă de către bromobenzen, iar nivelurile de expresie genică şi proteică au fost determinate la nivelul ficatului. La doze mari de bromobenzen, glutationul celular hepatic scade, evocând procese secundare cum sunt peroxidarea lipidică, care conduce în ultimă instanță la moartea celulară. În plus, toxicitatea bromobenzenului a fost corelată cu legarea covalentă a metabolților reactivi de bromobenzen la proteinele endogene, în special la cele care conțin grupări sulfidril [Koen şi colab., 2000]. Tratamentul cu bromobenzen a alterat modelul expresiei genice din ficatul de şobolan, aşa cum arată determinarea PCA şi analiza agregatelor (fig. 14.5). Animalele de control la care s-a injectat ulei de porumb, nu au putut fi diferențiate de grupul animalelor netratate. Importanța depleției nivelului intracelular de GSH datorată hepatotoxicității indusă de bromobenzen a fost coroborată cu decelarea unor grade diferite de expresie ale genelor implicate în metabolismul GSH. Subunitățile GST, care catalizează conjugarea metabolților reactivi la GSH, au fost reglate ca şi γ-glutamilcistein sintetaza, care este enzima de limitare a sintezei GSH. La verificare, s-a observat o creştere semnificativă a activității GST enzimatice la nivelul fracțiilor citosolice din ficatul de şobolan tratat cu bromobenzen comparativ cu grupul de control. Inducția epoxid hidroxilazei microsomale este corelată cu rolul acesteia în hidroxilarea intermediarilor de epoxid-bromobenzen. Alte enzime specifice metabolizării medicamentoase au fost de asemenea modificate. S-a arătat că multe dintre genele induse au fost sub controlul transcripțional al elementului de răspuns electrofil (EpRE, cunoscut anterior ca ARE) [Tsuji şi colab., 2000]. Inducția genică specifică precum hem oxigenaza-1, peroxidoxina1, metalotioneinele , feritina şi TIMP1 indică prezența stresului oxidativ. Doza crescută de bromobenzen facilitează clar un răspuns bine cunoscut cum este răspunsul de fază acută. Tehnologia proteomică care foloseşte gel electroforeza bidimensională a fost utilizată pentru a separa mostrele de proteine din ficat. În figura 14.5(A) este prezentat modelul proteic obținut de la un animal netratat. Figura 14.5(B)

prezintă o analiză gel bidimensională tipică a proteinelor hepatice dintr-un ficat al unui şobolan tratat cu bromobenzen. Modificări semnificative focale au fost identificate în MS. Printre altele, s-a observat că bromobenzenul induce o creştere a aldehid-dehidrogenazei 2 mitocondriale, şi o scădere în stocurile proteinei de şoc termic 60 şi a subunității proteice β a ATP-azei. Bromobenzenul a indus specific o modificare a conformației proteice, de la proteine cu greutate moleculară mare către proteine cu greutate moleculară mică şi transcripția genică a multor factori implicați în sinteza proteinelor cum ar fi proteinele ribozomale, inițierea translației şi factorii de elongare care sugerează o rată crescută a turnoverului proteic. Probe de plasmă şi urină au fost colectate de la şobolanii expuşi la bromobenzen. Spectrul RMN plasmatic şi urinar al şobolanilor tratați cu bromobenzen a fost diferit față de cel obținut din probele de control.

14.5. Concluzii

Toxicogenomica definită ca o aplicație şi un element de integrare al transcriptomicii, proteomicii şi metabolomicii în toxicologie, va servi multor scopuri în ceea ce priveşte recunoaşterea şi tratarea toxicologiei la nivel molecular. Mai întâi este important ca descoperirile experimentelor funcționale genomice să fie puse în legătură cu cunoştințele deja existente şi determinările toxicologice convenționale. Rezultate ale laboratoarelor de specialitate arată că un progres uriaş în domeniul toxicologiei se va realiza odată cu dezvoltarea tehnologiilor funcționale genomice. Mecanismele de acțiune ale toxicității vor putea fi elucidate în detaliu, la momente inițiale ale evoluției lor şi la doze scăzute, comparativ cu parametrii convenționali ai toxicității. Se aşteaptă îmbunătățiri în domeniul toxicologiei din aplicarea toxicogenomicii, ce presupun descoperirea unor noi markeri, extrapolări crescute şi evaluarea toxicității combinatorii. În special, în ceea ce priveşte testarea siguranței medicamentelor, unde importanța unei complete monitorizări a posibilelor efecte adverse induse de către un compus asupra întregului organism este deosebit de importantă, se observă că abordarea genomică funcțională se dovedeşte a fi din ce în ce mai utilă.

CAPITOLUL 15

IMPORTANȚA POLIMORFISMULUI GENETIC ŞI A INTERACȚIUNILOR MEDICAMENTOASE ÎN TRATAMENTUL DURERII

15.1. Introducere

Variabilitatea interindividuală farmacocinetică şi farmacodinamică pentru numeroase analgezice poate fi abordată din punct de vedere farmacogenetic, prin studierea bazelor eredității diferențelor răspunsului la un tratament medicamentos. Anumite enzime ce acționeză pentru metabolizarea medicamentelor, transportul medicamentelor sau pentru medicamentele țintă sunt într-adevăr supuse unui polimorfism genetic care este definit prin diferențele existente în expresia genică ce au o frecvență mai mare de 1% în populație.

Polimorfismul enzimatic (mai ales citocromii P450(CYP)) şi transportorii membranari [cum ar fi glicoproteina P(P-gp)] sunt deosebit de importanți în domeniul analgezic. Populația diferă în patrimoniul său genetic şi în răspunsul său la medicamente. Consecințele clinice posibile ale administrării dozelor standard de substanțe metabolizate de către enzimele supuse unui polimorfism genic vor merge de la toxicitatea medicamentoasă la absența eficacității după analgezic şi polimorfismul considerat. Polimorfismul enzimatic este important când medicamentul este eliminat în proporție de 50% de către o enzima polimorfică, când medicamentul are o fereastră terapeutică îngustă, sau în sfârşit când activitatea medicamentului depinde de un metabolit format de către o enzimă polimorfică (pro-medicament). De asemenea, interacțiunile medicamentoase sunt o sursă importantă de variabilitate care merită sa fie luată în considerație datorită existenței inhibitorilor şi inductorilor CYP sau P-gp care pot sa imite defectele genetice.

Xenobioticele, şi mai ales medicamentele analgezice sunt frecvent hidrofobe şi de aceea trebuie să fie transformate în compuşi mai hidrofili pentru a fi eliminați din organism. Pentru a realiza această transformare, organismul dispune de enzime capabile să metabolizeze un număr mare de xenobiotice. Aceste enzime sunt clasificate în două categorii: *enzime de funcționare*, sau de faza I[a], care grupează reductazele,oxidazele, şi hidrolazele, şi *enzimele de conjugare*, sau de faza II[a], care grupează toate transferazele (glucuronidaze, sulfataze, acetilaze, metilaze). Anumite enzime de faza II[a] prezintă un polimorfism genetic, şi familia de uridine difosfatice (UDP)-glucuroniltransferazele (UGTs) hepatice participă la metabolismul anumitor analgezice, cum ar fi morfina. Pentru că importanța clinică a enzimelor de faza a II[a] nu a fost pe deplin elucidată, vom prezenta în continuare familia de enzime de faza I[a], enzimele CYP deoarece au un rol important in metabolismul analgezicelor (figura 15.1).

	CYP						
	1A2	2B6	2C9	2C19	2D6	2D1	3A4
Aceclofenac							
Acid mefenamic							
Alfentanil							
Amitriptilina							
Buprenorfina							
Celecoxib							
Citalopram							
Clomipramina							
Codeina							
Dextrometorfan							
Diclofenac							
Dihidrocodeina							
Escitalopram							
Fentanil							
Fluoxetina							
Flurbiprofen							
Fluvoxamina							

Hidrocodon							
Ibuprofen							
Imipramina							
Indometacin							
Maprotilina							
Meloxicam							
Metadona							
Mianserina							
Naproxen							
Nortriptilin							
Oxicodon							
Paracetamol							
Paroxetin							
Piroxicam							
Sertralin							
Tenoxicam							
Tramadol							
Trimipramin							
Valdecoxib							

Cale metabolică majoră	
Cale metabolică minoră	

Fig.15.1 Căile metabolice ale analgezicelor substraturi ale citocromilor P450 (CYP)
Substraturile sunt clasificate în ordine alfabetică după denumirea lor internațională (listă non exhaustivă). Diferiții citocromi P450 implicați în metabolismul analgezicelor listate sunt indicate sus. Pătratele negre indică o cale metabolică importantă, pătratele gri: o cale metabolică mai puțin importantă.

Polimorfismul genetic al CYP şi impactul lor clinic vor fi evidențiate în cele ce urmează.Transportorii prezintă în egală masură o variabilitate genetică şi P-gp,care este pompa transmembranară de eflux, ar putea influența variabilitatea răspunsului la anumite opiacee prin modularea biodisponibilității lor sistemice şi cerebrale.

Metodele diagnostice, cum ar fi fenotipajul şi genotipajul, care sunt acum disponibile vor putea permite o individualizare terapeutică selecționând analgezicul şi

pozologia optimă pentru fiecare pacient. De aceea noi vom prezenta în continuare diferitele tehnici şi perspective pentru viitor.

15.2. Polimorfismul genetic:efectele asupra diferitelor analgezice

15.2.1. CYP, polimorfism genetic, interacţiuni medicamentoase şi consecinţe clinice

Localizate în reticulul endoplasmic al celulelor hepatice, CYPs catalizează oxidarea substanţelor lipofile endogene (steroizi, acizi graşi, acizi biliari) şi exogene (medicamente) transformându-le în produşi mult mai polari facilitând astfel eliminarea lor (Rogers şi colab., 2002).

Superfamilia CYP este clasificată pe baza omologiei secvenţelor de aminoacizi în familii (sub 40% omologie a secvenţei proteice în aceeaşi familie, de ex.CYP2) şi în subfamilii (peste 50% omologie,de ex,CYP2D). Samer şi colab., (2005) arată că superfamilia CYP conţine 74 familii de gene din care 35 la om, şi se clasifică în 14 familii. Membrii subfamiliilor care reprezintă o anumită genă sunt în continuare desemnaţi printr-un număr care succede descripţiei subfamiliei (de ex.CYPD6). O genă care se situează pe un locus specific de pe un cromozom dat se poate manifesta sub diferite forme sau alele. Cele două alele sunt purtate de către un individ pe un locus reprezentând genotipul. Un asterix şi un număr care desemnează o alelă, alela *1 corespunde la o activitate enzimatică normală(alela sălbatică).

Un polimorfism genetic cu o traducere funcţională este descris pentru anumiţi citocromi implicaţi în metabolismul analgezicilor (figura 15.1), cum ar fi CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 şi CYP3A4/5. Aceeaşi citocromi sunt pe de o parte inductibili şi/represibili; cantitatea de proteine enzimatice poate într-adevar să varieze când, la co-administrarea de substanţe cunoscute pentru capacitatea lor de a induce sau inhiba CYPs (figura 15.2 şi 15.3) se va antrena o modificare a profilului activităţii enzimatice (fenotip).

	CYP	
	2C9	3A4
Aminoglutamida		
Amprenavir		
Carbamazepina		
Ciclofosfamida		
Dexametazona		
Efavirenz		
Etanol		
Felbamat		
Ifosfamid		
Meprobamat		
Millepertuis		
Nevirapina		
Oxacarbazepina		
Fenobarbital		
Fenilbutazona		
Fenitoina		
Primidona		
Rifabutin		
Rifampicina		
Ritonavir		
Topiramat		
Inhibitor puternic		
Inhibitor moderat		

Fig.15.2 Principalii inductori ai citocromilorP450(CYP) 2C9 şi 3A4. Inductorii sunt clasificaţi în ordine alfabetică după denumirea lor. Puterea de inducţie este indicată printr-un pătrat negru (inductor puternic) sau gri (inductor moderat). Nu există inductori ai citocromului 2D6. Impactul interacţiunii va depinde de importanţa relativă a căii de eliminare inhibată în raport cu clairence-ul şi concentraţia plasmatică a inhibitorului. Administrarea concomitentă a unui substrat şi a unui inhibitor pentru acelaşi citocrom accelerează eliminarea substratului. Dacă tratamentul inhibitor este oprit,activitatea citocromului revine la normal după eliminarea inhibitorului .

	CYP				CYP		
	2C9	2D6	3A4		2C9	2D6	3A4
Acid valproic				Izoniazida			
Amiodarona				Itraconazol			
Amprenavir				Ketoconazol			
Bupropion				Levomepromazina			
Celecoxib				Losartan			
Silibinina				Metadona			
Clorochina				Metronidazol			
Clorpromazina				Miconazol			
Cimetidina				Moclobemid			
Ciprofloxacin				Nateglinid			
Citalopram				Nefazodon			
Claritromicina				Nelfinavir			
Clomipramina				Nifedipin			
Clopidogrel				Nitrendipin			
Delavirdin				Paroxetin			
Desogestrel				Fenilbutazona			
Dihidralazina				Fenitoin			
Diltiazem				Prometazin			
Difenhidramina				Propafenona			
Efavirenz				Timidina			
Eritromicina				Risperidon			
Etilynestradiol				Ritonavir			
Flecainida				Roxitromicina			
Fluconazol				Saquinavir			
Fluoxetin				Sertralin			
Fluvastatina				Simvastatina			
Fluvoxamin				Terbinafin			
Gemfibrozil				Tioridazin			
Gestoden				Tacrolimus			
Grapefruit				Valdecoxib			
Halofantrin				Venlafaxin			

Haloperidol				Verapamil			
Imatinib				Voriconazol			
Indinavir				Zafirlukast			
Irbesartan							
Inhibitor puternic							
Inhibitor moderat							

Figura 15.3 Principalii inhibitori ai citocromilor P450(CZP)2C9, 2D6 şi 3A4. Inhibitorii sunt clasificaţi în ordine alfabetică după denumirea internaţională. Puterea de inhibiţie este indicată printr-un pătrat negru (inhibitor puternic) sau gri (inhibitor moderat). Impactul interacţiunii va depinde de importanţa relativă a căii de eliminare inhibată în raport cu clearence-ul total şi concentraţiile plasmatice ale inhibitorului. Administrarea concomitentă a unui substrat şi a unui inhibitor pentru acelaşi citocrom încetineşte eliminarea substratului. Dacă tratamentul inductor este oprit, activitatea citocromului revine progresiv la normal (> 2 săptămâni).

15.2.2. Polimorfismul CYP2C9 şi anti-inflamatoarele nonsteroidiene

15.2.2.1. Aspecte genetice

Subfamilia CYP2C cuprinde patru enzime (Samer şi colab,2005): 2C8, 2C9/10, 2C18 şi 2C19 a căror genă este localizată pe cromozomul 10. CYP2C9/10 este proteina cea mai abundentă din această subfamilie. Cea mai mare parte a substraturilor pentru CYP2C9 sunt acizii slabi şi o interacţiune electrostatică pare să fie determinantă în afinitatea compuşilor pentru CYP2C9.Acesta posedă un polimorfism genetic şi şase variante alelice (Scordo şi colab.,2001). Trei dintre ele sunt descrise la caucazieni: CYP2C9*1, *2 şi *3. CYP2C9*1 (80-82%) codifică pentru o enzimă a cărei activitate este normală (tipul sălbatic) în timp ce CYP2C9*2 (11%) prezintă o substituţie a aminoacidului din poziţia 144 unde arginina este înlocuită de către cisteină ceea ce reduce activitatea enzimatică a lui CYP2C9*2. A treia varianta alelică CYP2C9*3 (7 – 9 %) prezintă o substituţie a izoleucinei cu leucina în poziţia 359 ce antrenează o diminuare a activităţii enzimatice de cinci până la zece ori în funcţie de substrat. Există o variabilitate interetnică în distribuţia acestor alele. Astfel, prevalenţa lui CYP2C9*2 este de 4% la etiopieni, în timp ce este absentă în Extremul Orient, pe când CYP2C9*3 este identică în aceste populaţii (2%). De asemenea a fost descris un polimorfism la nivelul promotorului (Shintani şi colab.,2001).

15.2.2.2. Consecințe clinice

Polimorfismul lui CYP2C9 ar putea juca un rol important în eficacitatea analgezicului şi toxicitatea anti-inflamatoarelor nonsteroidiene (AINS). Studiile *in vitro* au identificat anumite AINS ca substraturi ale CYP2C9: ibuprofen, indometacin, flurbiprofen, naproxen, diclofenac, piroxicam, lornoxicam, acid mefenamic, meloxicam şi celecoxib. Astfel, la purtătorii homozigoți ai CYP2C9*3 tratați cu ibuprofen sau cu celecoxib clairance-ul oral al acestor substanțe este diminuat de peste două ori şi perioada de înjumătățire este prelungită, în comparație cu genotipul CYP2C9*1/*1 (sălbatic). CYP2C9 are un efect enantiospecific asupra parametrilor farmacocinetici ai enantiomerului S de la ibuprofen. El acționează pe de altă parte asupra parametrilor farmacodinamici inhibând într-o manieră evidentă prostaglandina E2 la purtătorii homozigoți ai CYP2C9*3 (Kirchheiner şi colab.,2003). Sub celecoxib, concentrațiile plasmatice ale metaboliților sunt diminuate la indivizii homozigoți sau heterozigoți purtători ai alelei CYP2C9*3. Concentrațiile crescute de celecoxib ar putea altera beneficiile selectivității pentru ciclooxigenaza-2 (COX-2),modificând astfel rata sa de eficacitate-toxicitate. Alte studii nu au constatat totuşi impactul semnificativ al CYP2C9 asupra parametrilor farmacocinetici sau selectivității diclofenacului sau celecoxibului în condiții de echilibru (Brenner si colab.,2003). Pe de altă parte, un alt studiu retrospectiv nu a găsit o corelație între ulcerele gastrice induse de către substraturile AINS ale CYP2C9 şi genotipul CYP2C9. Totuşi datorită numărului mic de pacienți (n=24) nu s-a constatat o legatură între genotipul CYP2C9 şi hepatotoxicitatea indusă de diclofenac.

15.2.3. Polimorfismul CYP2D6

15.2.3.1 Aspecte genetice

Polimorfismul CYP2D6 rămâne unul din exemplele cel mai bine studiate şi cel mai bine înțelese ale polimorfismului farmacogentic. Descoperit în anii 70 de două grupuri de cercetare independente el a fost recunoscut ca polimorfismul debrisokină/sparteină, din cauza efectelor indezirabile, neobişnuite şi marcante puse în evidență în urma administrării unui antihipertensor simpaticolitic, debrisokina, sau

a unui alcaloid antiaritmic, sparteina. Studiile familiale au arătat că deficitul oxidativ este sub control monogenic. Gena este situată pe cromozomul 22, transmisă pe cale autosomal recesivă şi are 80 de variante alelice (http://www.imm.ki.se./CYPalleles) (Zanger şi colab.,2004).

Pe baza activității enzimatice (fenotip) indivizii au fost împărțiți în patru grupe:

- metabolizatori lenți („poor metabolizer" PM) cu o deficiență enzimatică completă, reprezentând 5 până la 10% dintre caucazieni;
- metabolizatori intermediari („intermediate metabolizers"IM) cu activitate enzimatică diminuată (10% caucazieni);
- metabolizatori buni, care au o activitate enzimatică normală („extensive" EM) reprezintă 60-70 % dintre caucazieni;
- metabolizatori ultrarapizi („ultrarapid metabolizers"UM) care au un metabolism accelerat (1-10% dintre caucazieni).

Metabolizatorii/metabolizanții lenți-PM sunt homozigoți pentru o alelă defectă (cel puțin 15 variante descrise), sau mai rar, combinând două alele defecte distinct. În Europa mai mult de 90% dintre PM pot fi detectați prin cercetarea celor trei variante mai frecvente care la caucazieni sunt: CYP2D6*4 (20 la 25%, prezentă la 70-90% dintre PM) datorată unei mutații ce antrenează un episaj deficient şi un codon stop prematur, CYP2D6*5 (5%) care prezintă o deleție completă a genei şi CYP2D6*3 (2%) care este rezultatul deleției unei baze. Metabolizanții intermediari-IM sunt purtătorii unei alele ce antrenează o diminuare a activității enzimatice (exemplu:CYP2D6*17). Metabolizanții ultrarapizi-UM sunt purtători ai unei gene duplicată şi multiplicată (CYP2D6*1,*2x/N) ca urmare a unui crossingover inegal. Duplicațiile genice şi mutațiile nu explică totuşi toate fenotipurile.

Polimorfismul genetic al CYP2D6 prezintă o variabilitate interetnică pe care-l explicăm prin distribuția principalelor variante alelice. Astfel cu excepția caucazienilor, PM sunt rari în alte populații etnice. Ceea ce se explică parțial prin frecvența unei variante alelice ce codifică pentru o enzimă inactivă prezentă la 10-20% dintre caucazieni şi cvasiabsentă la asiatici şi africani (sub 2%). Metabolizanții intermediari-IM sunt mai frecvent prezenți în Asia, până la 50% dintre asiatici fiind

purtători ai CYP2D6*10 care codifică pentru o enzimă instabilă (sub 2% la caucazieni). În sfârsit, duplicațiile genetice prezintă de asemenea o variabilitate interetnică, frecvența UM este estimată la 20% în Orientul Apropiat şi de până la 29% în Etiopia. În Europa, există un gradient Nord/Sud când ne referim la frecvența duplicațiilor genei CYP2D6: 1- 2% la suedezi, 3,6% la germani, 3,9% la elvețieni, 7 până la 10% la spanioli şi 10% la sicilieni care sunt UM (Bertilsson şi colab.,2002).

15.2.3.2. Consecințe clinice

CYP2D6 joacă un rol primordial în metabolismul unui sfert dintre medicamentele prescrise curent. Acestea au o adesea o marjă terapeutică îngustă cum este în cazul a numeroşi opioizi şi antidepresori. Consecințele terapeutice vor varia în funcție de importanța moleculei mamă sau de activitatea metabolitului în eficacitatea şi toxicitatea moleculei. Astfel, metabolizatorii ultrarapizi ai CYP2D6 care au o activitate enzimatică crescută vor accelera eliminarea antidepresorilor –substraturi ale CYP2D6 şi la doze ordinare ne putem aştepta la o ineficacitate a tratamentului. În schimb la PM, nivelurile plasmatice vor creşte la dozele obişnuite şi de asemenea creşte eficacitatea dar şi toxicitatea, şi ca urmare ajustarea pozologiilor este indispensabilă.

15.2.4. CYP2D6 şi opioidele

Opioidele slabe cum ar fi codeina şi tramadolul, dar şi anumite opioide considerate ca puternice cum ar fi hidrocodonul şi oxicodonul sunt bioactivați de către CYP2D6, ceea ce poate afecta eficacitatea şi toxicitatea lor.

Codeina trebuie să fie activată de către CYP2D6 (O-demetilare) pentru a-şi desfăşura efectul său analgezic (fig. 15.4). La indivizii EM ai CYP2D6, aproximativ 10% din codeină este bioactivată în morfină (Gasche şi colab.,2004). Studiile randomizate controlate au demonstrat ineficacitatea codeinei la PM. Eficacitatea analgezică a codeinei ar fi deci limitată la pacienții PM. În schimb, la UM se va constata că efectele codeinei şi a derivaților săi se accentuează, iar producția morfinei creşte. Astfel, o intoxicare severă cu codeină la pozologiile standard a antrenat o

comă prelungită la un pacient al cărui genotipaj şi fenotipaj al CYP2D6 a pus in evidenţă un metabolism ultrarapid al CYP2D.

Tramadolul foarte apropiat structural de codeină are o eficacitate opioidă asemănătoare. Analgezic cu acţiune centrală, tramadolul posedă proprietăţi farmacologice care îl diferenţiază de alte opioide. Tramadolul posedă o slabă afinitate pentru receptorul opioid μ, spre deosebire de metabolitul său M1, O-demetil-tramadolul, produs sub acţiunea CYP2D6, care are proprietăţi analgezice şi o afinitate pentru receptorul opioid μ ce este de 200 de ori superioară substanţei mamă (Samer şi colab., 2005). Activitatea CYP2D6 are un rol important în efectul analgezic al tramadolului confirmat de studiile experimentale şi clinice. Tramadolul poate sa-şi exercite efectul său analgezic pe calea activării monoaminergicelor inhibitoare descendente, inhibând recapturarea serotoninei şi nonadrenalinei. Din cauza acestui mod dublu de acţiune, tramadolul este deci diferit de opioidele tradiţionale datorită efectelor indezirabile şi activităţii analgezice. Spre deosebire de codeină, el rămâne activ la indivizii PM din cauza proprietăţilor monoaminergice ale substanţei mamă. Astfel la un metabolizator lent, mecanismul analgezic al tramadolului se poate modifica.

Dacă activitatea CYP2D6 scade, efectul opioid se atenuează,în timp ce efectul monaminergic creşte. Dimpotrivă, o creştere a numărului de alele funcţionale ale CYP2D6 creşte cantitatea metabolitului M1, confirmând legătura între producţia metabolitului şi genotipul CYP2D6.

Un studiu prospectiv realizat pe 300 de pacienţi a evaluat impactul genotipului CYP2D6 asupra răspunsului la tramadol în analgezia postoperatorie după chirurgia abdominală. Pacienţii care nu răspund sunt de două ori mai numeroşi printre PM (46,7%), comparativ cu EM (21,6%); PM au de două ori mai frecventă nevoie de antialgice de siguranţă (tramadol şi piritramid) în sala de trezire(43vs 21%) şi consumul de tramadol prin injectarea auto-controlată prin pompa *iv* creşte la PM (26,7% vs11,6%). Consumul de tramadol la PM fiind pe de altă parte mai mare cu 30% faţă de cei EM (Levo şi colab.,2003).

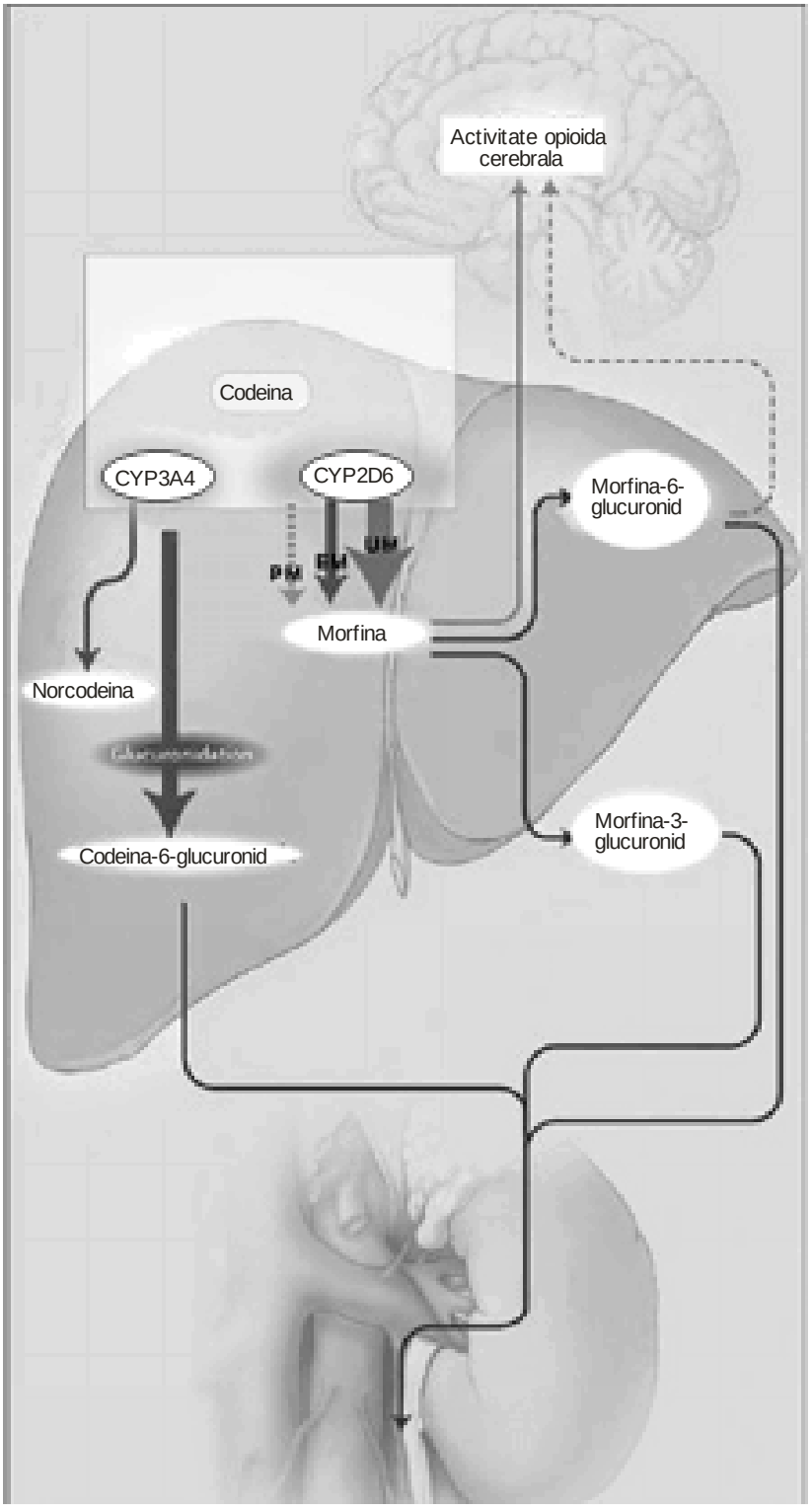


Figura 15.4.Căile de metabolizare ale codeinei şi eliminarea metaboliților săi. Codeina este metabolizată în principal (305) în codein 6-glucuronid şi într-o mică măsură în norcodein prin intermediul citocromului P450 3A4. La un individ care este un bun metabolizator pentru citocromul 2D6 proporția de morfină produsă echivalează în medie cu 10% din doza de codeină. Dimpotrivă, la un metabolizator ultrarapid, producția de morfină creşte. Morfina este în continuare metabolizată în morfină 6-glucuronid (care posedă o activitate opioidă) şi în morfină 3-glucuronid. Aceşti doi metaboliți ca şi codeina 6-glucuronid sunt în continuare eliminați pe cale renală.

Metadona este un opioid puternic care este uneori utilizat ca analgezic. Există diferențe inter-individuale importante în concentrațiile metadonei care se explică parțial prin activitatea CYP2D6. Concentrațiile sanguine ale metadonei în stare de echilibru au fost studiate la 256 de pacienți toxicomani şi au fost mai crescute la PM şi mai scăzute la UM. Mai mult de 70% dintre PM aveau un tratament de substituție eficace (față de 40% la UM). La fel, 50% dintre UM şi numai 28% dintre PM au primit doze de metadonă superioare la 100mg pe zi (Eap şi colab.,2001).

15.2.5 CYP2D6 şi blocanții N-metil-D-aspartat(NMDA)

Dextrometorfanul (DEM) este un derivat morfinic şi nonarcotic (analog dextrogirului codeinei) lipsit de activitate opioidă care acționează *in vivo* ca antagonist necompetitiv al receptorului NDMA. De asemenea DEM pare să posede o activitate neuromodulatoare. El este metabolizat în dextrorfan (DOR) de către CYP2D6 şi este utilizat ca substrat test pentru a fenotipa aceasta cale metabolică. DEM este rapid transformat în DOR la EM. Datele experimentale arată că DEM exercită un efect antinociceptiv şi neuromodulator mai evident la CYP2D6 al PM, spre deosebire de efectele de durată mai scurtă observate la EM. Deci, CYP2D6 ar putea juca un rol important în efectul neuromodulator al DEM şi ar explica contradicțiile asupra impactului său clinic în studiile randomizate controlate peri-operator în prevenția durerilor.

15.2.6. CYP2D6 şi dependența de opiacee

Se pare ca PM ar putea fi protejați împotriva dependenței la opiacee pentru anumite molecule. Astfel, niciun PM nu a fost regăsit prin genotipaj şi fenotipaj în grupele de pacienți dependenți de opiacee de tipul codeinei, spre deosebire de pacienții care n-au fost niciodată dependenți de aceste substanțe (4%) sau dependenți de numeroase alte substanțe (alcool, cocaină, amfetamine; 6,5%). Această subîmparțire a metabolizatorilor lenți la pacienții dependenți de opiacee sugerează că aceştia au o protecție farmacogenetică împotriva dependenței orale la opiacee (odd ratio > 7). Inhibiția CYP2D6, care blochează producția de morfină, ar putea astfel să

permită modularea riscului de dependență blocând aceste căi metabolice. Totuşi primele teste clinice n-au confirmat această ipoteză (Fernandes şi colab.,2002).

15.2.7. CYP2D6 şi antidepresorii ca co-analgezice

Antidepresorii sunt utilizați adesa drept co-analgezice. Un anumit număr de mecanisme au fost implicate în efectul lor analgezic. Antidepresorii triciclici au rol să inhibe recapturarea presinaptică a adrenalinei (NA) şi serotoninei (5-HT) şi să blocheze receptorii alfa-1 –adrenergici, muscarinci şi histaminici. Inhibitorii selectivi de recapturare a serotoninei (ISRS) acționează mai ales asupra 5-HT. Venlafaxina este un nou agent chimic specific triciclicilor şi ISRS, ce inhibă recaptura NA şi 5-HT, mai ales la doze scăzute şi se dovedeşte eficace în tratamentul durerilor neuropatice. Antidepresorii sunt asociați cu o incidență relativ crescută a efectelor indezirabile care pot limita administrarea lor la pacienții care au dureri.

Principalii antidepresori sunt metabolizați de către CYP2D6 (fig.15.1). Mai mult de 25% dintre pacienți nu răspund la antidepresori şi fenotipul UM este acum recunoscut ca factor de risc al ineficacității terapeutice. Dimpotrivă, PM exprimă efecte toxice la doze uzual recomandate ceea ce s-ar putea explica prin variabilitatea concentrațiilor plasmatice (30 la 40 de ori) observată în urma administrării unor doze similare.

Studiile farmacocinetice indică de exemplu ca la PM, clairence-ul amitriptilinei, clomipraminei, desipraminei, imipraminei, nortriptilin, trimipraminei, paroxetinei, citalopramului, fluvoxaminei, fluoxetinei şi venlafaxinei este diminuat şi în consecință concentrațiile plasmatice sunt crescute (Bertilsson şi colab.,2002). De asemenea, asocierea dintre efectele indezirabile şi genotipul CYP2D6 a fost bine studiat. O metaanaliză arată o corelație pozitivă între riscul toxicității neurologice şi concentrațiile plasmatice medicamentoase (Samer şi colab.,2005). O frecvență crescută a CYP2D6 a fost observată la pacienții PM care prezintă efecte indezirabile. Dintr-un studiu prospectiv al pacienților tratați cu desipramin (100mg/zi -[1] timp de trei saptămâni), s-a observat că numai pacienții cu fenotip PM pentru CYP2D6 au prezentat efecte indezirabile (confuzie, sedare, hipotensiune ortostatică). Pe de altă

parte, aceste efecte au fost corelate cu nivelurile plasmatice crescute ceea ce necesită reducerea dozei (Spina şi colab.,1997). S-a sugerat că există o relație între fenotipul PM şi cardiotoxicitate (palpitații, dispnee, aritmie) la pacienții PM tratați cu venlafaxina. Printre pacienții ce prezintă efectele indezirabile la tratamentul cu substraturi antidepresoare pentru CYP2D6 sunt de două ori mai mulți PM. Trebuie să menționam că există o variație a dozelor eficiente în tratamentul depresiei care ar fi de 25 la 300mg pentru clomipramin fie la PM, fie la UM. Chinezii (majoritatea indivizi UM) metabolizează antidepresorii (desipramin, nortriptilin, clomipramin) mai lent şi vor primi în general doze mai scăzute de antidepresori. Astfel, primele recomandări de doze în funcție de genotip/fenotip al CYP2D6 privind 14 antidepresori au fost făcute de Kirchheiner şi colab.,(2001). Pentru antidepresorii triciclici PM este recomandată o reducere a dozelor de la 50 la 80% ,iar pentru ISRS de 30%. Pentru UM dozele recomandate cresc la 260% pentru desipramin, 300% pentru mianserin, şi 300% pentru nortriptilin (Samer şi colab.,2005). Astfel, genotipajul ar putea să permită individualizarea pozologiilor.

15.2.8. Polimorfismul CYP3A

Familia CYP3A are rol în biotransformarea în proporție de 45-60% a medicamentelor dintre care menționăm opioidele naturale (codeina) sau sintetice (tramadol, buprenorfin, metadon, fentanyl şi dextrometorfan) (Desmeules şi colab., 2004). În anumite populații există diferențe interindividuale în expresia CYP3A. Subfamilia CYP3A cuprinde patru gene: CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 şi CYP3A43 situate pe cromozomul 7.

În subfamilia CYP3A, enzima cea mai abundentă şi mai importantă la nivelul reacțiilor oxidative este CYP3A4. Ea a fost izolată pe baza activității sale oxidante asupra nifedipin şi variabilității metabolismului nifedipinului (de peste 10 ori), ceea ce sugerează existența unui polimorfism genetic. Deşi sunt descrise variantele alelice ale CYP3A, niciuna nu determină o modificare semnificativă a activității enzimatice. CYP3A5 este exprimată la 20-30% dintre caucazieni, ceea ce reprezintă cel puțin 50% din conținutul total al CYP3A hepatice la persoanele care îl exprimă, participând

la variabilitatea interindividuală în eliminarea medicamentelor dependente de CYP3A. S-a arătat că numai pacienții posedând cel puțin o alelă a CYP3A5 *1 exprimă CYP3A5, în timp ce CYP3A5*3 şi CYP3A5*6 nu exprimă CYP3A5 (Kuehl şi colab.,2001). Specificitatea substratului CYP3A5 este asemănătoare cu a CYP3A4 (dar el este în general mai puțin activ) şi CYP3A5 pare să metabolizeze cea mai mare parte a substraturilor CYP3A4. Astfel, chiar dacă s-a raportat o largă variabilitate interindividuală a CYP3A4, nu s-a identificat un polimorfism fenotipic şi noțiunea de metabolizator lent sau de metabolizator ultrarapid nu poate fi aplicată.

15.2.9. Interacțiunile medicamentoase şi CYP

Medicamentele administrate concomitent pot, datorită interacțiunii medicamentoase farmacocintetice, să modifice activitățile CYP (fig. 15.1, 15.2 şi 15.3). Inhibiții competitive pot interfera cu activitatea lor. Astfel concentrațiile plasmatice ale substraturilor CYP2C9 pot să crească odată cu administrarea de amiodaronă, fluvastatin, fluconazol, fenilbutazonă, sulfinpirazon, sulfafenazol sau sulfamide, care sunt inhibitori puternici şi selectivi ai CYP2C9. Dimpotrivă, substraturile CYP2C9 pot fi induse sub acțiunea următoarelor medicamente: carbamazepin, etanol sau fenobarbiton şi o scădere a concentrațiilor şi eficacității AINS ar putea fi previzibilă (Desmeules şi colab.,2004).

Nu se cunosc inductori ai CYP2D6, dimpotrivă inhibitorii CYP2D6 sunt bine descrişi cum ar fi de exemplu, antiaritmicele (chinidina) sau neurolepticele cum ar fi clorpromazin, haloperidol, levopromazin sau tioridazin şi un mare număr de antidepresori (fig. 15.3). Odată cu administrarea unui inhibitor şi a unui substrat al CYP2D6 sunt posibile diferite scenarii în funcție de activitatea moleculei mamă respective. Astfel, se poate pune în evidență o creştere a concentrațiilor plasmatice ale antidepresorilor ce sunt substraturi ale CYP2D6 sau o inactivare a promedicamentelor de tipul opioidelor slabe.

Factorii de mediu (de exemplu, la nivel alimentar, sucul de grepfrut fiind inhibitor al CYP3A4) şi interacțiunile medicamentoase (inhibiția sau inducția; fig.15. 2 şi 15.3) contribuie în mare parte la variabilitatea activității catalitice a CYP3A4. În

plus, consecințele lor clinice vor depinde de activitatea substanței mamă şi de metaboliții săi. Metadona este metabolizată de către CYP3A4 (şi CYP2D6) cum o demonstrează studiile *in vitro* şi studiile indirecte care arată o diminuare sau o creştere a concentrațiilor plasmatice ale metadonei la pacienții sub tratament de întreținere după administrarea inductorilor sau inhibitorilor CYP3A4. Astfel, simptomele de sevraj la opioide sunt descrise la pacienții sub metadonă tratați pentru tuberculoză prin rifampicină, pe calea reducerii concentrațiilor plasmatice ale metadonei.

Inhibitorii CYP3A4 ca macrolidele şi anumiți antidepresori ca paroxetin,sau neuroleptice ca olanzapin (fig. 15.3) vor determina pe de altă parte o reducere a clairence-ul metadonei şi vor creşte riscul de supradozaj. Shinderman şi colab.,(2003) au observat o corelație între concentrațiile plasmatice ale metadonei şi starea de echlibru şi activitate a CYP3A4. Alte studii *in vitro* arată că antiproteazele (ritonavir, indinavir, saquinavir) sunt inhibitori *in vitro* ai metabolismului metadonei şi buprenorfinei. La fel, CYP3A4 este izoforma cea mai responsabilă de dezalchilarea fenantyl, alfentanil şi sulfentanil. Astfel rifampicina un inductor al CYP3A4 creşte de trei ori clereance-ul alfentanil, spre deosebire de macrolide care-l scade de patru la cinci ori.

Midazolamul este un benzodiazepin hidrosolubil cu o scurtă durată de acțiune, care este (ca majoritatea benzodiazepinelor) substrat al CYP3A4. Interacțiunile farmacocinetice cu substanțele inhibtoare ale CYP3A4 (fig.15.2) pot să conducă la o creştere a efectelor sale indezirabile, din cauza creşterii concentrațiilor sale plasmatice. Astfel, la un pacient de 61 de ani a fost descrisă o comă prelungită după ce a primit midazolam (doză totală cumulată 300 mg) pentru o sedare în timpul cardioversiunii electrice, amiodaronă în cadrul episoadelor de tachiaritmii supraventriculare, ca şi pentru o antibioterapie prin eritromicină pentru o pneumopatie acută. Coma (şase zile) a fost indusă în prelungirea perioadei de înjumătățire a midazolamului mai mult de 24 de ore, de către inhibitorii CYP3A4 care sunt ritromicina şi amiodarona (Samer şi colab.,2005).

15.3. P-gp:un alt exemplu al variabilității genetice

15.3.1 P-gp şi aspectele genetice

P-gp este un produs al genei MDR1 (proteină rezistentă la mai multe medicamente) care aparține la o superfamilie de transportori ABC (caseta de legare la ATP). Inițial MDR1 a fost identificată şi studiată la nivelul celulelor tumorale rezistente la chimioterapia anticanceroasă. Ea este o proteină de transport membranar care expulzează medicamentele în afara celulelor şi le scade concentrația la nivelul țintelor tisulare. Localizarea sa la nivel intestinal, hepatic, renal şi al barierei hemato-encefalice explică probabil rolul său protector asupra anumitor regiuni, cum ar fi creierul împiedicând acumularea medicamentelor în organele țintă. P-gp este acum subiectul unei variabilități interindividuale de expresie şi de funcționare datorită pe de o parte polimorfismului genetic la care este supusă gena MDR1 şi pe de altă parte datorită posibilelor interacțiuni medicamentoase (inductori şi inhibitori ai P-gp).

Pentru gena MDR1 au fost descrise treizeci de mutații (Hoffmeyer şi colab.,2000). Două dintre ele au fost investigate: mutația G2677T/A care antrenează o schimbare de aminoacid şi mutația silențioasă C3435T. Această ultimă mutație este supusă la o variabilitate interetnică: frecvența indivizilor homozigoți pentru alelele C şi T este prezentă la 25% dintre caucazieni şi asiatici şi numai la 6% dintre africani. Variabilitățile sunt raportate în Europa de Est, frecvența genotipurilor CC şi TT fiind de 42%,41% şi 17%. În Quebec ea este de respectiv 16%, 55% şi 29% (Samer şi colab., 2005).

15.3.2 P-gp şi consecințele clinice

Variabilitatea expresiei P-gp poate avea un impact asupra absorbției şi distribuței medicamentelor.Când un individ dispune de o cantitate scazută de P-gp intestinală, cantitatea substraturilor absorbite şi concentrațiile plasmatice vor fi mai ridicate. Genotipul 3435TT a fost astfel asociat cu o expresie de două ori mai scăzută a transportorului la nivel de duoden decât genotipul CT şi TT (Hoffmeyer şi colab.,2000). Pe de altă parte s-a constatat că de regulă concentrațiile digoxinei în

stare de echilibru sunt mai ridicate la voluntarii sănătoşi purtători ai alelei T (Jolme şi colab., 2002).

Substraturile P-gp au în comun proprietăţi fizice cum ar fi, un ciclu aromatic, o hidrofobicitate, o greutate moleculară cuprinsă între 200 şi 1800Da sau un grup azotat cationic. Pe de altă ,trebuie menţionat că majoritatea substraturilor şi inhibitorilor P-gp sunt de asemenea substraturi şi inhibitori ai CYP3A4. Genele lor sunt dispuse în apropiere pe acelaşi cromozom (7q22.1 şi 7q21.1) şi la nivel intestinal ar putea exista o corelaţie între polimorfismul C3435T al MDR1 şi nivelul expresiei CYP3A4.

Opioidele au în comun o structură aromatică cu trei inele şi un inel piperidin substituit, şi sunt din această cauză candidaţi buni pentru a fi substraturi ale P-gp.

Studiile *in vitro* au demonstrat că loperamidul, morfina, metadona, meperidin, hidromorfon, naloxon, naltrexon, pentozacin sunt transportaţi de către P-gp. Există rezultate contradictorii pentru fentanyl. Sulfentanyl-sulfentanil şi alfentanyl-alfentanil nu sunt substraturi pentru P-gp. Dimpotrivă, aceste ultime trei substanţe sunt inhibitori *in vitro* ai P-gp (la concentraţii puţin comparabile cu cele administrate în clinică). Anumite endorfine şi enkefaline sunt de asemenea substraturi ale P-gp (Oude şi Zadina, 2001).

Studiile experimentale *in vivo* la animale au arătat pe de altă parte un rol posibil al P-gp asupra modulării medicamentelor anti-nociceptive. Astfel la şoarecii deficienţi în P-gp a fost evidenţiată o creştere a efectului anti-nociceptiv al enkefalinei sintetice (DPDE) în comparaţie cu şoarecii normali datorită unei ameliorări a biodisponibilităţii cerebrale. În aceeaşi manieră la şobolanul care a primit un inhibitor puternic al P-gp şi o doză unică *iv* de morfină, efectele anti-nonciceptive sunt prelungite în raport cu şobolanii netrataţi. Aceste schimbări nu sunt decât imperfect corelate cu schimbările farmacocinetice plasmatice ale morfinei. Activitatea *in vivo* la animal a altor opioide cum ar fi meperidin, metadonă şi fentanyl ar putea să fie influenţată de expresia P-gp. La om, loperamidul, un opiaceu utilizat pentru efectul său antidiareic, acţionează asupra receptorilor pentru opiaceele intestinale reducând motilitatea intestinală şi este la doze standard, lipsit de efecte centrale. Dimpotrivă, un pretratament cu chinidină (600mg administrată cu o oră

înainte), un inhibitor al P-gp conduce la o depresie respiratorie (Skarke şi colab.,2003) şi o diminuare a diametrului pupilar. Deşi chinidina creşte absorbția şi concentrațiile plasmatice ale morfinei, metadonei şi fentanylului,după administrare orală chinidina nu are efect asupra farmacodinamiei celor trei substanțe după administrarea intravenoasă. Pe de altă parte, utilizarea dozelor unice ai inhibitorilor P-gp (valspodar, chinidină) la voluntari sănătoşi la care s-au administrat *iv* doze mici de morfină nu s-a asociat cu o modificare a parametrilor farmacocinetici sau farmacodinamici ai morfinei (Skarke şi colab.,2003). Aceste rezultate ar putea să indice la om că P-gp nu ar influența decât în mică măsură biodisponibilitaea cerebrală a morfinei,metadonei şi fentanylului.

15.4. Fenotipaj şi genotipaj: perspective

Anumite metode diagnostice sunt acum disponibile în majoritatea spitalelor universitare. Ele permit identificarea rapidă (1-2 zile) a anomaliilor şi variațiilor metabolismului la nivelul citocromilor. Sunt mai frecvent utilizate două metode: *fenotipajul* care permite identificarea activității enzimatice a citocromilor, fenotipul reflectând caracteristicile observate ale activității enzimatice ale unui pacient, şi *genotipajul* care detectează variantele alelice descrise până acum reflectând caracteristicile de la nivelul ADNului.

15.4.1. Tehnici

Fenotipajul estimează activitatea enzimatică a citocromilor. Un substrat test („ probe drug „) ce corespunde la un citocrom specific este administrat la un pacient, apoi are loc măsurarea cantității de substanță mamă şi metabolismul său în sânge sau urină. Aceste dozaje permit calculul ratei metabolismului sau raportul între cantitatea de moleculă mamă (neschimbată) şi cantitatea metabolitului său la un anumit timp după ingestia substratului test, dar de asemenea şi a altor parametrii farmacocionetici cum ar fi clairance-ul total. Astfel pentru CYP2D6 substraturile test utilizate sunt sparteina, debrisochina, sau dextrometorfan. De exemplu, după ingestia a 25 mg de dextrometorfan seara la culcare şi vezica goală, urina de peste noapte este colectată la

8-12 ore şi concentraţiile de dextrometorfan (Bexine) şi dextrorfan sunt apoi dozate din urină. După care raporturile metabolice sunt calculate. Ele definesc activitatea enzimatică şi variază în funcţie de substratul test utilizat. Raporturile metabolice ce definesc fenotipul PM sunt: >12,6 pentru debrisochin, >20 pentru spartein, şi >0,3 pentru dextrometorfan. Fenotipul UM este definit prin următoarele raporturi metabolice: <0,2 pentru debrisochin, <0,15 pentru spartein , <0,003 pentru dextrometorfan. Spre deosebire de PM care constituie un grup distinct, definiţia valorilor prag ce corespund la fenotipul UM este făcută de manieră mai arbitrară. Substraturile test ce pot fi utilizate pentru fenotipajul CYP2C9 sunt flurbiprofen, diclofenac, losartan, tolbutamid, şi warfarina. Fenotipajul CYP3A4 poate fi realizat cu midazolam, cortizol endogen, eritromicină sau dapson (Streetman şi colab.,2000). Amestecuri (cocktails) de substraturi test administrate concomitent au început să fie utilizate sau studiate. Ele au oferit avantajul de a realiza simultan fenotipajul diferiţilor citocromi (1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4) (Zhou şi colab., 2004; Jerdi şi colab., 2004). Fenotipajul permite detectarea inteacţiunilor medicamentoase pertinente când fenotipul pacientului este cunoscut în prealabil şi dacă un genotipaj este realizat în paralel. Într-adevăr, inhibitorii şi inductorii CYP tesaţi pot să modifice concentraţiile substratului test şi deci rata metabolică fenomen numit ”fenocopiere”. Fenotipajul prezintă avantajul de a fi o metodă rapidă, simplă, ieftină şi reproductibilă. Administrarea unei substanţe farmacologic active în scop diagnostic poate să pună probleme de ordin etic. Pe de altă parte, informaţiile de care dispunem asupra fenotipajului anumitor grupuri (copiii, persoane în vârstă, insuficienţe renale şi hepatice) sunt limitate.

Genotipajul permite analiza mutaţiilor genetice importante funcţional,care codifică pentru enzime specifice prin tehnica reacţiei de polimerizare în lanţ (PCR) cuplată cu o analiză a polimorfismului prin măsurarea lungimii fragmentelor de restricţie după hidroliză cu ajutorul enzimelor de restricţie. Jannette şi colab.,(2004) descriu în detaliu tehnicile de genotipaj. Informaţiile genetice despre individ sunt determinate în mod direct fară să necesite un substrat test. De altfel testul nu este influenţat de administrarea concomitentă de medicamente, sau de factorii de mediu şi

oferă avantajul de a fi realizat odată pentru toată viața. Tehnica aceasta este costisitoare şi sensibilitatea sa variază în funcție de citocromul analizat. Astfel datorită genotipului specific şi/sau mutațiilor încă necunoscute, CYP2D6 ai UM nu sunt toți detectați (Zanger şi colab.,2004). Progresul ştiințific în domeniu este rapid şi noi variante alelice sunt puse acum în evidență.

Metodele de detecție rapidă prin microarray ADN sunt frecvent utilizate. Microarray-urile sunt suporturile solide de câțiva centimetrii pătrați pe care pot să fie fixate de manieră organizată mii de secvențe de ADN diferite. Aceste fragmente servesc drept sonde genetice pentru a măsura nivelul expresiei genetice. Sondele genetice capturează de manieră foarte specifică fragmentele de ADN complementare conținute într-un eşantion biologic ce trebuie testat. Acest fenomen (hibridizare) poate fi evidențiat prin tehnicile optice sub lumină fluorescentă sau prin detecția radioactivității. Cuantificarea semnalelor obținute şi identificarea fragmentelor de gene recunoscute sunt posibile datorită unui sistem de achiziție de imagini, apoi pentru analiza datelor se face apel la programe informatice special concepute. Rezultatele obținute vor fi în continuare validate statistic şi interpretate în context biologic. Acum sunt utilizate două metode macro şi microarray cu depozitarea directă a moleculelor de ADN pe suportul lor şi cu fragmente de oligonucleotide sintetizate *in situ* ca sonde oligonucleotidice pe o suprafață solidă. Ele vor permite detecția mai rapidă şi la scară mai mare a diferitelor variante alelice.

15.4.2. Indicații în practica clinică şi perspective

La ora actuală, genotipajul şi fenotipajul citocromilor se justifcă retrospectiv la pacienții care nu răspund la un tratament adecvat, adică insuficient (eşec terapeutic) sau dimpotrivă la cei care au parte de un tratament excesiv (toxicitate medicamentoasă). Astfel se poate face distincția între o problemă de complianță şi un metabolism foarte rapid, când medicamentul este ineficace sau când concentrațiile sunt infraterapeutice ca în cazul antidepresorilor. Pe de altă parte , aceste tehnici permit distincția între o suspiciune de dependență medicamentoasă şi un deficit metabolic în cazul unui consum important de opiaceu slab, cum ar fi codeina

considerată ineficace pentru pacientul PM. Cuplajul celor două tehnici permite pe de altă parte detecția interacțiunilor medicamentoase pertinente când fenotipul pacientului este cunoscut în prealabil sau dacă un genotipaj este realizat în paralel.

Totuşi, la ora actuală, testele farmacogentice sunt limitate la spitalele universitare şi centrele specializate. Recomandările de doze în funcție de genotip trebuie să fie considerate într-adevăr ca un concept preliminar care trebuie să fie verificat. Eficacitatea şi utilitatea clinică a acestor teste diagnostice rămâne să fie validată prin studii prospective randomizate controlate, ca şi prin analizele farmacoeconomice (numărul de teste necesar pentru a evita un caz de toxicitate şi costurile asociate).

15.5. Concluzii

Terapia antalgică este un prototip important de individualizare a prescripției medicamentoase. Cea mai mare parte a analgezicelor este metabolizată de către CYP, ei înşişi fiind supuşi unui polimorfism genetic. Aceste polimorfisme pot să explice ineficacitatea sau dimpotrivă toxicitatea medicamentului. În perspectivă, detecția prin fenotipaj şi genotipaj a acestor polimorfisme ar putea să ne ofere metode rapide şi fiabile pentru a optimiza strategiile terapeutice anticipând efectele indezirabile (ineficacitate terapeutică), identificând medicamentul potrivit , prezicând pozologia cea mai eficace şi cea mai sigură pentru fiecare pacient. Pe de altă parte ne permite să distingem o problemă legată de un metabolism ultrarapid, de un abuz medicamentos a unui deficit metabolic. Analiza cost/beneficiu a acestor metode trebuie să fie totuşi confirmată de către studii prospective adecvate.

BIBLIOGRAFIE

ABECASIS GR, NOGUCHI E, HEINZMANN A, TRAHERNE JA, BHATTACHARYYA S, LEAVES NI, ANDERSON GG, ZHANG Y, LENCH NJ, CAREY A, CARDON LR, MOFFATT MF, COOKSON WOC. 2001. Extent and distribution of linkage disequilibrium in three genomic regions. *Am J Hum Genet* 68, 191–7.

ADAMS MD, CELNIKER SE, HOLT RA, EVANS CA, GOCAYNE JD, AMANATIDES PG, SCHERER SE, LI PW, HOSKINS RA, GALLE RF. et al. The genome sequence of Drosophila melanogaster. 2000. *Science* 287, 2185–95.

ALBANO CL, BENTLEY WE, RAO G. 2001. High throughput studies of gene expression using green fluorescent protein–oxidative stress promoter probe constructs. *J Biomol Screen* 6, 421–8.

AMEYAW MM, REGATEIRO F, LI T, LIU X, TARIQ M, MOBAREK A, THORNTON N, FOLAYAN GO, GITHANGA J, INDALO A, OFORI-ADJEI D, PRICE-EVANS DA, MCLEOD HL. 2001. MDR1 pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation in exon 26 is significantly *Pharmacogenetics* 11, 217–21.

ANGERS S, SALAHPOUR A, JOLY E, HILAIRET S, CHELSKY D, DENNIS M, BOUVIER M. 2000. Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 3684–9.

ARDELEAN A, TRIPŞA M, 2001. Mecanisme de transport în sistemele biologice. *Foreign Languages Press Group,* Arad, 9-22,26-36,150-195.

ARRANZ MJ, MUNRO J, BIRKETT J, BOLONNA A, MANCAMA D, SODHI M, LESCH KP, MEYER JF, SHAM P, COLLIER DA, MURRAY RM, KERWIN RW. 2000. Pharmacogenetic prediction of clozapin response. *Lancet* 355, 1615–6.

ARRANZ MJ, MUNRO J, SHAM P, KIROV G, MURRAY RM, COLLIER DA, KERWIN RW. 1998. Meta-analysis of studies on genetic variation in 5HT-2A receptors and clozapine response. *Schiz Res* 32, 93–9.

ATREYA HS, CHARY KVR. 2001. Selective ‘‘unlabeling’’ of amino acids in fractionally ^{13}C labeled proteins: an approach for stereospecific NMR assignments of CH_3 groups in Val and Leu residues. *J Biomol NMR* 19, 267–72.

BAETS S, VANDEDRINCK S, VANDAMME EJ, in: LEDERBERG J, editorin-chief. 2000. *Encyclopedia of Microbiology*, 2nd edn, vol. 4, 837–53, Academic Press, San Diego, CA.

BAKKER RA., LEURS R. 2004, From the human genome to new drugs: The potential of orphan G-protein coupled receptors in: DINGERMANN TH, STEINHILBER D, FOLKERS G. eds. *Molecular Biology in Medicinal Chemistry.* 95 -123, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

BALARAM P, BOTHNER-BY A, DADOK J. 1972. Negative nuclear Overhauser effects as probes of macromolecular structure, *J Am Chem Soc* 94, 4015–7.

BARAK LS, FERGUSON SS, ZHANG J, CARON MG. 1997. A beta-arrestin/green fluorescent protein biosensor for detecting G protein-coupled receptor activation. *J Biol Chem* 272, 27497–500.

BARTOSIEWICZ MJ, JENKINS D, PENN S, EMERY J, BUCKPITT A. 2001. Unique gene expression patterns in liver and kidney associated with exposure to chemical toxicants. *J Pharmacol Exp Ther* 297, 895–905.

BAUMANN W, LEHMANN M, BITZENHOFER M, SCHWINDE A, BIRSCHWEIN M, EHRET R, WOLF B. 1999. Microelectronic sensor system for microphysiological application on living cells. *Sensors and Acuators B* 55, 77–89.

BAXTER DF, KIRK M, GARCIA AF, RAIMONDI A, HOLMQVIST MH, FLINT KK, BOJANIC D, DISTEFANO PS, CURTIS R, XIE Y. 2002. A novel membrane potential-sensitive fluorescent dye improves cell-based assays for ion channels. *J Biomol Screen* 7, 79–85.

BĂTRÎNESCU GH. şi colab., 2006. Procese de membrană în biotehnologii. *Ars Docendi.* Universitatea din Bucureşti, 15-80

BECK-SICKINGER AG. 1996. Structural characterization and binding sites of G-protein-coupled receptors. *Drug Discov Today* 1, 502–13.

BERGER J, HAUBER J, HAUBER R, GEIGER R, CULLEN BR. 1988. Secreted placental alkaline phosphatase: a powerful new quantitative indicator of gene expression in eukaryotic cells. *Gene* 66, 1–10.

BERTILSSON L, DAHL ML, DALEN P, Al SHURBAJI A. 2002. Molecular genetics of CYP2D6: clinical relevance with focus on psychotropic drugs. *Br J Clin Pharmacol* 53, 111–22.

BERTILSSON L, DAHL ML, DALEN P, et al., 2002. Molecular genetics of CYP 2D6: clinical relevance with focus and psychotropic drugs. *Br J Clin Pharmacol,* 53: 111-122.

BIEKOFSKY RR, MARTIN SR, MCCORMICK JE, MASINO L, FEFEU S, BAYLEY PM, FEENEY J. 2002. Thermal stability of calmodulin and mutants studied by ^{1}H-^{15}N HSQC NMR measurements of selectively labeled [^{15}N]Ile proteins. *Biochemistry* 41, 6850–9.

BLAISDELL J, MOHRENWEISER H, JACKSON J, FERGUSON S, COULTER S, CHANAS B, et al. 2002. Identification and functional characterization of new potentially defective alleles of human CYP2C19. *Pharmacogenetics* 12, 703–11.

BLAKE JA, RICHARDSON JE, BULT CJ, KADIN JA, EPPIG JT, and the members of the Mouse Genome Database Group. MGD: The Mouse Genome Database. 2003. *Nucleic Acids Res* 31, 193–5.

BLEICHER K, LIN M, SHAPIRO M, WAREING J. 1998. Diffusion edited NMR: screening compound mixtures by affinity NMR to detect binding ligands to vancomycin, *J Org Chem* 63, 8486–90.

BOWIE JU. 2001. Stabilizing membrane proteins, *Curr Opin Struct Biol* 11, 397–402.

BRADFORD LD. 2002. CYP2D6 allele frequency in European Caucasians, Asians, Africans and their descendants. *Pharmacogenomics* 3, 229– 43.

BRANCHINI BR, MAGYAR RA, MURTIASHAW MH, PORTIER NC. 2001. The role of active site residue arginine 218 in firefly luciferase bioluminescence. *Biochemistry* 40, 2410–8.

BRANDNER G, PHALIP V, KELLENBERGER E, ZHANG CC. 1999. Optimization of a cyanobacterial culture for production of isotope-labeled recombinant proteins. *Biotechnol Tech* 13, 177– 80

BRAZMA A, VILO J. 2000, Gene expression data analysis, *FEBS Lett* 480, 17–24.

BRENNAN MD. 2002. High throughput genotyping technologies for pharmacogenomics. *Am J Pharmacogenomics* 1, 295–302.

BRENNER SS, HERRLINGER C, DILGER K, et al., 2003. Influence of age and cytochrome P450 2C9 genotype on the steady-state disposition of diclofenac and celecoxib. *Clin Pharmacokinet,* 42:283-292.

BRINKMANN U, EICHELBAUM M. 2001. Polymorphisms in the ABC drug transporter gene MDR1. *Pharmacogenomics* 1, 59–64.

BRIVANLOU AH, DARNELL JE, Jr. 2002. Signal transduction and the control of gene expression. *Science* 295, 813–8.

BROACH JR, THORNER J. 1996. Highthroughput screening for drug discovery. *Nature* 384, 14–6.

BROCKMOLLER J, KIRCHHEINER J, SCHMIDER J, WALTER S, SACHSE C, MULLER-OERLINGHAUSEN B, et al. 2002. The impact of the CYP2D6 polymorphism on

haloperidol pharmacokinetics and on the outcome of haloperidol treatment. *Clin Pharmacol Ther* 72, 438–52

BROOKES AJ. 1999. The essence of SNPs. *Gene* 234, 177–86.

BRØSEN K, GRAM LF. 1993. The pharmacogenetics of the selective serotonin reuptake inhibitors. *Clin Invest* 71, 1002–9.

BRUNET A, ROUX D, LENORMAND P, DOWD S, KEYSE S, POUYSSEGUR J. 1999. Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. *EMBO J* 18, 664–74.

BULERA SJ et al., 2001, RNA expression in the early characterization of hepatotoxicants in Wistar rats by high-density DNA microarrays, *Hepatology* 33, 1239–1258.

BURMESTER J, PLÜCKTHUN A. 2001. Construction of scFv fragments from hybridoma or spleen cells by PCR assembly, in: KONTERMANN R, DÜBEL S, eds, *Antibody Engineering* 19–40, Springer, Berlin.

BURNASHEV N, ROZOV A. 2000. Genomic control of receptor function. *Cell Mol Life Sci* 57, 1499–507.

BYRNE B, IWATA S. 2002. Membrane protein complexes, *Curr Opin Struct Biol* 12, 239–43.

CAMILLERI-BROET S, VANDERWERFF H, CALDWELL E, HOCKENBERY D. 1998. Distinct alterations in mitochondrial mass and function characterize different models of apoptosis. *Exp Cell Res* 239, 277–92.

CARLSSON J, JANSON J-C, SPERRMAN M, in: JANSON J-C, RYDEN L, eds, 1998. *Protein Purification: Principles, High- Resolution Methods and Applications*, 2nd edn, 375–442, Wiley, New York

CASCORBI I, GERLOFF T, JOHNE A, MEISEL C, HOFFMEYER S, SCHWAB M, SCHAEFFELER E, EICHELBAUM M, BRINKMANN U, ROOTS I. 2001. Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects. *Clin Pharmacol Ther* 69, 169–74.

CELIS JE, KRUHOFFER M, GROMOVA I, FREDERIKSEN C, OSTERGRAAD M, THYKJAER T, GROMOV P, VU J, PÀLSDOTTIR H, MAGNUSSON N, ORTNTOFT TF. 2000. Gene expression profiling: monitoring transcription and translation products using DNA microarrays and proteomics. *FEBS Lett* 480, 2–16.

CEREGHINO JL, CREGG JM. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia Pastoris. FEMS Microbiol Rev* 24, 45–66.

CHADEE DN, HENDZEL MJ, TYLIPSKI CP, ALLIS CD, BAZETT-JONES DP, WRIGHT JA, DAVIE JR. 1999. Increased Ser-10 phosphorylation of histone H3 in mitogen-stimulated and oncogenetransformed mouse fibroblasts. *J Biol Chem* 274, 24914–20.

CHALFIE M, TU Y, EUSKIRCHEN G, WARD WW, PRASHER DC. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802–5.

CHANKVETADZE B. 2004, Recent trends in enantioseparation of chiral drugs in: DINGERMANN TH, STEINHILBER D, FOLKERS G. eds. *Molecular Biology in Medicinal Chemistry.* 181 -211, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

CHEBIB M, JOHNSTON GA. 2000.GABA-activated ligand gated ion channels: medicinal chemistry and molecular biology. *J Med Chem* 43, 1427–47.

CHEKULAYEVA MN, KURNASOV OV, SHIROKOV VA, SPIRIN AS. 2001. Continuous-exchange cell-free protein synthesizing system: synthesis of HIV-1 antigen Nef. *Biochem Biophys Res Commun* 280, 914–7.

CHEN A, SHAPIRO MJ. 1998. NOE pumping: a novel NMR technique for identification of compounds with binding affinity to macromolecules, *J Am Chem Soc* 120, 10258–9.

CHEN A, SHAPIRO MJ. 2000. NOE Pumping. 2. A high-throughput method to determine compounds with binding affinity to macromolecules by NMR, *J Am Chem Soc* 122, 414–5.

CHOI KH, CHEN CJ, KRIEGLER M,RONINSON IB. 1988. An altered pattern of cross-resistance in multidrug-resistant human cells results from spontaneous mutations in the mdr1 (Pglycoprotein) gene. *Cell* 53, 519–29.

CHRISTENDAT D, YEE A, DHARAMSI A, KLUGER Y, SAVCHENKO A, CORT JR, BOOTH V, MACKERETH CD, SARIDAKIS V, EKIEL I, KOZLOV G, MAXWELL KL, WU N, MCINTOSH LP, GEHRING K, KENNEDY MA, DAVIDSON AR, PAI EF, GERSTEIN M, EDWARDS AM, ARROWSMITH CH. 2000. Structural proteomics of an archaeon. *Nat Struct Biol 7*, 903–9.

CLORE G, SCHWIETERS C. 2002. Theoretical and computational advances in biomolecular NMR spectroscopy, *Curr Opin Struct Biol* 12, 146–53.

COLLINS A, LONJOU C, MORTON NE.1999. Genetic epidemiology of singlenucleotide polymorphisms. *Proc Natl Sci Acad USA* 96, 15173–7.

CONWAY BR, MINOR LK, XU JZ, GUNNET JW, DEBIASIO R, D'ANDREA MR, RUBIN R, DEBIASIO R, GIULIANO K, DEBIASIO L, DEMAREST KT. 1999. Quantification of G-protein coupled receptor internalization using G protein coupled receptor-green fluorescent protein conjugates with the ArrayScanTM high-content screening system. *J Biomol Screen* 4, 75–86.

CRAIG D, HOWELL MT, GIBBS CL, HUNT T, JACKSON RJ. 1992. Plasmid cDNA-directed synthesis in a coupled eukaryotic *in vitro* transcription–translation system. *Nucleic Acids Res* 20, 4987–995.

CRONIN MT, PHO M, DEBJANI D,FRUEH F, SCHWARCZ L, BRENNAN T.2001. Utilization of new technologiesin drug trials and discovery. *Drug Metab Dispos* 29, 586–90.

CRUCE M, 2000. Biologie celulară şi moleculară. *Ed.Aius*. Craiova, 193-252.

CRUCE M, ARDELEAN A, STĂNOIU B şi colab. 2004. Căi şi rețele de semnalizare celulară. *Ed. Aius Craiova*: 49-63, 67-87, 157-173.

CUBBEDU L, MOSS CX, SWARBRICK JD, GOOLEY AA, WILLIAMS KL, CURMI PMG, SLADE MB, MABBUTT BC. 2000. *Dictyostelium discoideum* as expression host: isotopic labeling of a recombinant glycoprotein for NMR studies. *Protein Express Purif* 19, 335–42.

DAHL ML, JOHANSSON I, BERTILSSON L, INGELMAN-SUNDBERG M, SJOQVIST F. 1995. Ultrarapid hydroxylation of debrisoquine in a Swedish population. Analysis of the molecular genetic basis. *J Pharmacol Exp Ther* 274, 516–20.

DAHL ML. 2002. Cytochrome p450 phenotyping/ genotyping in patients receiving antipsychotics: useful aid to prescribing? *Clin Pharmacokinet* 41, 453–70.

DALVIT C, FOGLIATTO G, STEWART A, VERONESI M, STOCKMAN B, Water-LOGSY as a method for primary NMR screening: practical aspects and range of applicability, *J Biomol* NMR 21, 349–59, 2001.

DALVIT C. 1998. Effective multi-solvent suppression for the study of organic solvents with macromolecules, *J Biomol* NMR 11, 437–44.

DE LAMOTTE F, BOZE H, BLANCHARD C, KLEIN C, MOULIN G, GAUTIER MF, DELSUC MA. 2001. NMR onitoring of accumulation and folding of ^{15}Nlabeled protein overexpressed in *Pichia pastoris*. *Protein Express Purif* 22, 318–24.

DE WIT R, HENDRIX CM, BOONSTRA J, VERKLEU AJ, POST JA. 2000. Largescale screening assay to measure epidermal growth factor internalization. *J Biomol Screen* 5, 133–40.

DEAN M, HAMON Y, CHIMINI G. 2001. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter super family. *J Lipid Res* 42, 1007–17.

DENISOV V, HALLE B. 2002. Hydrogen exchange rates in proteins from water 1H transverse magnetic relaxation, *J Am Chem Soc* 124, 10264–5.

DERISI JL et al. 1997., Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale, *Science* 278, 680–6.

DESMEULES JA, PIGUET V, EHRET GB, et al., 2004. Pharmacogenetics, pharmacokinetics, and analgesia. in: Mogil J S(Ed.). The genetics of Pain, Progress in Pain Research and Managenment. *IASP Press,* 211-238.

DESPLANCQ D, KIEFFER B, SCHMIDT K, POSTEN C, FORSTER A, OUDET P, STRUB JM, VAN DORSSELAER A, WEISS E. 2001. Cost-effective and uniform ^{13}C- and ^{15}N-labeling of the 24-kDa Nterminal domain of the *Escherichia coli* gyrase B by overexpression in the photoautotrophic cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Protein Express Purif* 23, 207–17.

DICKMANN LJ, RETTIE AE, KNELLER MB, KIM RB, WOOD AJ, STEIN CM, et al. 2001. Identification and functional characterization of a new CYP2C9 variant (CYP2C9*5) expressed among African Americans. *Mol Pharmacol* 60, 382–7.

DIERCKS T, COLES M, KESSLER H. 2001. Applications of NMR in drug discovery, *Curr Opin Chem Biol* 5, 285–91.

DING GJ, FISCHER PA, BOLTZ RC, SCHMIDT JA, COLAIANNE JJ, GOUGH A, RUBIN RA, MILLER DK. 1998. Characterization and quantitation of NF-kappaB nuclear translocation induced by interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha. Development and use of a high capacity fluorescence cytometric system. *J Biol Chem* 273, 28897–905.

DINGER MC, BECK-SICKINGER AG. 2002. The first reporter gene assay on living cells: green fluorescent protein as reporter gene for the investigation of Gi-protein coupled receptors. *Mol Biotechnol* 21, 9–18.

DINGERMANN TH, STEINHILBER D, FOLKERS G. 2004. Molecular Biology in Medicinal Chemistry. *WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim* 133-134

DINGERMANN TH, STEINHILBER D, FOLKERS G. 2004. Molecular Biology in Medicinal Chemistry. *WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim* 136-137

DINGERMANN TH, STEINHILBER D, FOLKERS G. 2004. Molecular Biology in Medicinal Chemistry. *WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim* 142.

DRYSDALE CM, MCGRAW DW, STACK CB, STEPHENS JC, JUDSON RS, NANDABALAN K, ARNOLD K, RUANO G, LIGGETT SB. 2000. Complex promoter and coding region beta2-adrenergic receptor haplotypes alter receptor expression and predict in vivo responsiveness. *Proc Natl Acad Sci* USA 97, 10483–8.

DUROCHER Y, PERRET S, THIBAUDEAU E, GAUMOND MH, KAMEN A, STOCCO R, ABRAMOVITZ M. 2000. A reporter gene assay for high-throughput screening of G-protein-coupled receptors stably or transiently expressed in HEK293 EBNA cells.

EAP CB, BROLY F, MINO A, 2001. Cytochrome P4502D6 genotype and methadone steady-stae concentrations. *J Clin Psychopharmacol*, 21:229-234.

EAVES CJ. 1995. Assay of hematopoietic progenitor cells. In Beutler E, MA Lichtman, BS Collier, TJ Kipps (eds), *Williams Hematology*, 5th edn. New York: McGraw-Hill, 22–6.

EDWARDS BS, KUCKUCK FW, PROSSNITZ ER, RANSOM JT, SKLAR LA. 2001. HTPS flow cytometry: a novel platform for automated high throughput drug discovery and characterization. *J Biomol Screen* 6, 83–90.

EDWARDS SW, TAN CM, LIMBIRD LE. 2000. Localization of G-proteincoupled receptors in health and disease. *Trends Pharmacol Sci* 21, 304–8.

ENGBERG J, JENSEN LB, YENIDUNYA AF, BRANDT K, RIISE E. 2001. Phage-display libraries of murine antibody Fab fragments, in: KONTERMANN R, DÜBEL S, eds, *Antibody Engineering*, 65–92, Springer, Berlin.

ENGELS JE, PARSCH J. 2004, Nucleic acid drugs in: DINGERMANN TH, STEINHILBER D, FOLKERS G. eds. *Molecular Biology in Medicinal Chemistry.* 153 - 179, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

EPSTEIN CB, BUTOW RA. 2000. Microarray technology – enhanced versatility, persistent challenge. *Curr Opin Biotechnol* 11, 36–41.

EUSTICE DC, FELDMAN PA, COLBERG-POLEY AM, BUCKERY RM, NEUBAUER RH. 1991. A sensitive method for the detection of beta-galactosidase in transfected mammalian cells. *Biotechniques* 11, 739–40, 742–3.

EVANS TC, MARTIN D, KOLLY R, PANNE D, SUN L, GHOSH I, CHEN L, BENNER J, LIU XQ, XU MQ. 2000. Protein *trans*-splicing and cyclization by a naturally split intein from the *dnaE* gene of *Synechocystis* species PCC6803. *J Biol Chem* 275, 9091–4.

EVANS WE, JOHNSON JA. 2001. Pharmacogenomics: the inherited basis for interindividual differences indrug response. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2, 9–39.

EVANS WE, MCLEOD HL. 2003. Pharmacogenomics – drug disposition, drug targets and side effects. *N Engl J Med* 348, 538–49.

EVANS WE, RELLING MV. 1999. Pharmacogenomics: translatingfunctional genomics into rationaltherapeutics. *Science* 286, 487–91.

FARR SB, TODD MD. 1998. Methods and kits for eukaryotic gene profiling. President and Fellows of Harvard College (Cambridge, MA, Xenometrix, Inc.). *US Patent* 5,811,231.

FERNANDES LC, KILICARSLAN T, KAPLAN HL, et al., 2002. Treatment of codeine dependence with inhibitors of cytochrome P450 2D6. *J Clin Psychopharmacol,* 22:326-329.

FIEHN O. 2002. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol* 48, 155–71.

FIELDEN MR et al., 2002, *In silico* approaches to mechanistic and predictive toxicology: an introduction to bioinformatics for toxicologists, *Crit Rev Toxicol* 32, 67–112.

FISCHER MW, MAJUMDAR A, ZUIDERWEG ERP. 1998. Protein NMR relaxation: theory, application and outlook, *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* 33, 207–72.

FITZGERALD LR, MANNAN IJ, DYTKO GM, WU HL, NAMBI P. 1999. Measurement of responses from Gi-, Gs- or Gq-coupled receptors by a multiple response element/cAMP response element-directed reporter assay. *Anal Biochem* 275, 54–61.

FUKUDA H, ARAI M, KUWAJIMA K. 2000. Folding of green fluorescent protein and the cycle3 mutant. *Biochemistry* 39, 12025–32.

FURUTA T, SHIRAI N, WATANABE F, HONDA S, TAKEUCHI K, IIDA T, et al. 2002. Effect of cytochrome P4502C19 genotypic differences on cure rates for gastroesophageal reflux disease by lansoprazole. *Clin Pharmacol Ther* 72, 453–60.

GARAVITO RM, FERGUSON-MILLER S. 2001. Detergents as tools in membrane biochemistry, *J Biol Chem* 276, 32403–6.

GASCHE Y, DAALI Y, FATHI M, et al. 2004. Codeine intoxication associated with ultrarapid CYP2D6 metabolism.*N Engl J Med*, 351:2827-2831.

GEORGE SE, BUNGAY PJ, NAYLOR H. 1997. Functional coupling of edogenous serotonin (5-HT1B) and calcitonin (C1a) receptors in CHO cells to a cyclic AMP-responsive luciferase reporter gene. *J Neurochem* 69, 1278–85.

GHOSH RN, CHEN YT, DEBIASIO R, DEBIASIO RL, CONWAY BR, MINOR LK, DEMAREST KT. 2000. Cell-based, high-content screen for receptor internalization, recycling and intracellular trafficking. *Biotechniques* 29, 170–5.

GIFFORD DK. 2002. Blazing pathways through genetic mountains. *Science* 293, 2049–51.

GILHAM DE, CAIRNS W, PAINE MJ, MODI S, POULSOM R, ROBERTS GC, WOLF CR. 1997. Metabolism of MPTP by cytochrome P4502D6 and the demonstration of 2D6 mRNA in human foetal and adult brain by in situ hybridization. *Xenobiotica* 27, 111– 25.

GLASSBROOK N, BEECHER C, RYALS J. 2000. Metabolic profiling on the right path. *Nat Biotechnol* 18, 1142–3.

GLOOR GB. Gene-targeting in Drosophila validated. 2001. *Trends Genet* 17, 549–51.

GOETZ AS, ANDREWS JL, LITTLETON TR, IGNAR DM. 2000. Development of a facile method for high throughput screening with reporter gene assays. *J Biomol Screen* 5, 377–84..

GONZALEZ FJ, SKODA RC, KIMURA S,UMENO M, ZANGER UM, NEBERT DW, GELBOIN HV, HARDWICK JP, MEYERUA. 1988. Characterization of thecommon genetic defect in humansdeficient in debrisoquine metabolism. *Nature* 331, 442–6.

GOSSEN M, BUJARD H. Studying gene function in eukaryotes by conditional gene inactivation. 2002. *Annu Rev Genet* 36, 153–73.

GOTO NK, KAY LE. 2000. New developments in isotope labeling strategies for protein solution NMR spectroscopy. *Curr Opin Struct Biol* 10, 585–92.

GOUGH AC, SMITH CA, HOWELL SM, WOLF CR, BRYANT SP, SPURR NK. 1993. Localization of the CYP2D gene locus to human chromosome 22q13.1 by polymerase chain reaction, in situ hybridization, and linkage analysis. *Genomics* 15, 430–2.

GREENWALT DE, SZABO J, MANCHEL I. 2001. High throughput cell-based assay of hematopoietic progenitor differentiation. *J Biomol Screen* 6, 383–92.

GROTEN JP et al.., 2000, An analysis of the possibility for health implications ofjoint actions and interactions between food additives, *Regul Toxicol Pharmacol* 31, 77–91.

GU H, ZOU YR, RAJEWSKY K. Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through CreloxP- mediated gene targeting. 1993. *Cell* 73, 1155–64.

GÜNTHER U, LIU Y, SANFORD D, BACHOVCHIN W, SCHAFFHAUSEN B. 1996. NMR analysis of interactions of a PI-3 kinase SH2 domain with phosphotyrosine peptides reveals interdependence of major binding sites, *Biochemistry* 35, 15570–81.

GÜNTHER U, SCHAFFHAUSEN B. 2002. NMRKIN: simulating line shapes from two-dimensional spectra of proteins upon ligand binding, *J Biomol NMR* 22, 201–9.

HAJDUK P, BOYD S, NETTESHEIM D, NIENABER V, SEVERIN J, SMITH R, DAVIDSON D, ROCKWAY T, FESIK S. 2000. Identification of novel inhibitors of urokinase via NMR-based screening, J Med Chem 43, 3862–6.

HAJDUK P, GERFIN T, BOEHLEN J, HABERLI M, MAREK D, FESIK S. 1999. High-throughput nuclear magnetic resonance-based screening, *J Med Chem* 42, 2315–7.

HAJDUK P, OLEJNICZAK E, FESIK S. 1997. One-dimensional relaxation- and diffusion-edited NMR methods for screening compounds that bind to macromolecules, J Am Chem Soc 119, 12257–61.

HAJDUK PJ, AUGERI DJ, MACK J, MENDOZA R, YANG J, BETZ SF, FESIK SW. 2000. NMR-based screening of proteins containing 13C-labeled methyl groups, *J Am Chem Soc* 122, 7898–904.

HANAHAN D, WEINBERG RA. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70.

HEASMAN J. Morpholino oligos: making sense of antisense? 2002. *Dev Biol* 243, 209–214.

HEFTI JP, KUMAR A. 1999. Sensitive detection method of dielectric dispersions in aqueous based, surface bound macromolecular structures using microwave spectroscopy. *Appl Phys Lett* 75, 1802–4.

HEIJNE WH et al., 2003, Toxicogenomics of bromobenzene hepatotoxicity: a combined transcriptomics and proteomics approach, *Biochem Pharmacol* 651, 857–75.

HITZL M, DRESCHER S, VAN DER KH, SCHAFFELER E, FISCHER J, SCHWAB M, et al. 2001, The C3435T mutation in the human MDR1 gene is associated with altered efflux of the P-glycoprotein substrate rhodamine 123 from $CD56^+$ natural killer cells. *Pharmacogenetics* 11, 293–8.

HOFFMEYER S, BURK O, VON RICHTER O, ARNOLD HP, BROCKMOLLER J, JOHNE A, CASCORBI I, GERLOFF T,ROOTS I, EICHELBAUM M, BRINKMANN U. 2000. Functional polymorphisms of the human multidrug resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with Pglycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 3473–8.

HOFFMEYER S, BURK O, VON RICHTER O, et al ., 2000. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistence gene: multiple sequence variations and correlation of one allele withP-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA,* 97:3473-3478.

HOLMES E et al., 2001, Metabonomic characterization of genetic variations in toxicological and metabolic responses using probabilistic neural networks, *Chem Res Toxicol* 14, 182–91

HONDA A, ADAMS SR, SAWYER CL, LEV-RAM V, TSIEN RY, DOSTMANN WR. 2001. Spatiotemporal dynamics of guanosine 3',5'-cyclic monophosphate revealed by a genetically encoded, fluorescent indicator. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 2437–42.

HUNTE C, KANNT A. 2003. Antibody fragment mediated crystallization of membrane proteins, in: HUNTE C, VON JAGOW G, SCHÄGGER H, eds, *Membrane Protein Purification and Crystallization* 205–18, Elsevier Science, Amsterdam.

HUNTE C, MICHEL H. 2002. Crystallisation of membrane proteins mediated by antibody fragments, *Curr Opin Struct Biol* 12, 503–8.

HUNTE C, MICHEL H. 2003. Membrane protein crystallization, in: HUNTE C, VON JAGOW G, SCHÄGGER H, eds, *Membrane Protein Purification and Crystallization*, 143–60, Elsevier Science, Amsterdam.

HUNTE C. 2001. Insights from the structure of the yeast cytochrome bc1 complex: crystallization of membrane proteins with antibody fragments, *FEBS Lett* 504, 126–132.

HWANG LY, LIEU PT, PETERSON PA, YANG Y. 2001. Functional regulation of immunoproteasomes and transporter associated with antigen processing. *Immunol Res* 24, 245–72.

INGELMAN-SUNDBERG M, OSCARSON M, DALY AK, GARTE S, NEBERT DW. 2001. Human cytochrome P-450 (CYP) genes: a web page for the nomenclature of alleles. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10, 1307–8.

INGELMAN-SUNDBERG M. 2001. Genetic susceptibility to adverse effects of drugs and environmental toxicants. The role of the CYP family of enzymes. *Mutat Res* 482, 11–9.

INTERNATIONAL SNP MAP WORKINGGROUP. 2001. A map of the human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 409, 928–33.

ITO T, CHIBA T, YOSHIDA M. 2001. Exploring the protein interactome using comprehensive two-hybrid projects. *Trends Biotechnol* 19, S23–7.

JANN MW, COHEN LJ. 2000. The influence of ethnicity and antidepressant pharmacogenetics in the treatment of depression. *Drug Metab Drug Interact* 16, 39–67.

JANNETTO P J, LALELI-SAHIN E,WONG S H, 2004.Pharmacogenomic genotyping methodologies. *Clin Chem Lab Med*, 42:1256-1264.

JANSEN G, HAZENDONK E, THIJSSEN KL, PLASTERK RH. Reverse genetics by chemical mutagenesis in Caenorhabditis elegans. 1997. *Nat Genet* 17, 119–21.

JHONE A, KOPKE K, GERLOFF T, et al., 2002. Modulation of steady- state kinetics of digoxin by haplotypes of the P-glycoprotein MDR1 gene. *Clin Pharmacol ther*, 72:584-594.

JORGENSEN EM, MANGO SE. The art and design of genetic screens: caenorhabditis elegans. 2002. *Nat Rev Genet* 3, 356–69.

KAGIMOTO M, HEIM M, KAGIMOTO K, ZEUGIN T, MEYER UA. 1990. Multiple mutations of the human cytochrome P450IID6 gene (CYP2D6) in poor metabolizers of debrisoquine. Study of the functional significance of individual mutations by expression of chimeric genes. *J Biol Chem* 265, 17209–14.

KAISER R, SEZER O, PAPIES A, BAUER S, SCHELENZ C, TREMBLAY PB, et al., 2002. Patient-tailored antiemetic treatment with 5-hydroxytryptamine type 3 receptor antagonists according to cytochrome P-450 2D6 genotypes. *J Clin Oncol* 20, 2805–11.

KANG SH, OH TJ, KIM RG, KANG TJ, HWANG SH, LEE EY, CHOI CY. 2000. An efficient cell-free protein synthesis system using periplasmic phosphatase-removed S30 extract. *J Microbiol Methods* 43, 91–6.

KARP PD. 2001. Pathway databases: a case study in computational symbolic theories. *Science* 293, 2040–4.

KAWAMURA M, OHARA S, KOIKE T, IIJIMA K, SUZUKI J, KAYABA S, et al. 2003. The effects of lansoprazole on erosive reflux oesophagitis are influenced by CYP2C19 polymorphism. *Aliment Pharmacol Ther* 17, 965–73.

KIM DM, SWARTZ JR. 2000. Prolonging cell-free protein synthesis by selective reagent additions. *Biotech Prog* 16, 385–90.

KIM RB, LEAKE BF, CHOO EF, DRESSER GK, KUBBA SV, SCHWARZ UI, TAYLOR A, XIE HG, MCKINSEY J, ZHOU S, LAN LB, SCHUETZ JD, SCHUETZ EG, WILKINSON GR. 2001. Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin Pharmacol Ther* 70, 189–99.

KIMCHI-SARFATY C, GRIBAR JJ, GOTTESMAN MM., 2002. .Functional characterization of coding polymorphisms in the human MDR1 gene using a vaccinia virus expression system. *Mol Pharmacol*, 62, 1–6.

KIMURA S, UMENO M, SKODA RC, MEYER UA, GONZALEZ FJ. 1989. The human debrisoquine 4-hydroxylase (CYP2D) locus: sequence and identification of the polymorphic CYP2D6 gene, a related gene and a pseudogene. *Am J Hum Genet* 45, 889–904.

KIRCHHEINER J, BROSEN K, DAHL ML, GRAM LF, KASPER S, ROOTS I, et al., 2001. CYP2D6 and CYP2C19 genotype based dose recommendations for antidepressants: a first step towards subpopulation-specific dosages. *Acta Psychiatr Scand* 104, 173–92.

KIRCHHEINER J, MEINEKE I, STEINBACH N, MEISEL C, ROOTS I, BROCKMOLLER J., 2003. Pharmacokinetics of diclofenac and inhibition of cyclooxygenases 1 and 2: no relationship to the CYP2C9 genetic polymorphism in humans. *Br J Clin Pharmacol*, 55, 51–61.

KIRCHHEINER J, STORMER E, MEISEL C, et al., 2003. Influence of CYP2C9 genetic polymorphisms on pharmacokinetics of celecoxib and its metabolites. *Pharmacogenetics*, 13: 473-480.

KOEN YM et al., 2000, Identification of three protein targets for reactive metabolites of bromobenzene in rat liver cytosol, *Chem Res Toxicol* 13, 1326–35.

KOTARSKY K, OWMAN C, OLDE B. 2001. A chimeric reporter gene allowing for clone selection and high-throughput screening of reporter cell lines expressing G-protein-coupled receptors. *Anal Biochem* 288, 209–15.

KRUGLYAK L. 1999. Prospects for whole-genome linkage disequilibrium mapping of common disease genes. *Nat Genet* 22, 139–44.

KUEHL P, ZHANG J, LIN Y, et al., 2001.Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet,* 27: 383-391.

KUHLBRANDT W. 2003. Two-dimensional crystallization of membrane proteins: a practical guide, in: HUNTE C, VON JAGOW G, SCHÄGGER H, eds, *Membrane Protein Purification and Crystallization*, 253–84, Elsevier Science, Amsterdam.

KUIVENHOVEN JA, JUKEMA JW, ZWINDERMAN AH, DE KNIJFF P, MCPHERSON R, BRUSHCKE AV, LIE KI, KASTELEIN JJ. 1998. The role of a common variant of the cholesteryl ester transfer protein gene in the progression of coronary atherosclerosis. The Regression Growth Evaluation Statin Study Group. *N Engl J Med* 338, 86–93.

KWIATKOWSKI RW, LYAMICHEV V, DE ARRUDA M, NERI B. 1999. Clinical, genetic, and pharmacogenetic applications of the Invader assay. *Mol Diagn* 4, 353–64.

LANDER ES, et al. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome, *Nature* 409, 860–921.

LANGE C, HUNTE C. 2002. Crystal structure of the yeast cytochrome bc1 complex with its bound substrate cytochrome c, *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 2800–5.

LEE JT, KROEMER HK, SILBERSTEIN DJ, FUNCK-BRENTANO C, LINEBERRY MD, WOOD AJ, RODEN DM, WOOSLEY RL. 1990. The role of genetically determined polymorphic drug metabolism in the beta blockade produced by propafenone. *N Engl J Med* 322, 1764–8.

LEFKOWITZ RJ. 2000. The superfamily of heptahelical receptors. *Nat Cell Biol* 2, E133–6.

LEOF EB. 2000. Growth factor receptor signaling: location location location. *Trends Cell Biol* 10, 343–8.

LESLIE AG, MOODY PC, SHAW WV. 1988. Structure of chloramphenicol acetyltransferase at 1.75-A resolution. *Proc Natl Acad Sci* USA 85, 4133–7.

LEVO A, KOSKI A, OJANPERA I, 2003. Post-morten SNP analysis of CYP2D6 gene reveals correlation between genotype and opioid drug (tramadol) metabolite ratios in blood. *Forensic Sci Int*, 135:9-15.

LIESE A, SEELBACH K, BUCHHOLZ A, HABERLAND J, in: LIESE A, SEELBACH K, WANDREY C. 2000. Eds *Industrial Biotransformations*, 95–392, Wiley-VCH, Weinheim.

LIN M, SHAPIRO M. 1996. Mixture analysis in combinatorial chemistry, application of diffusion-resolved NMR spectroscopy, *J Org Chem* 61, 7617–9.

LIN M, SHAPIRO MJ, WAREING JR. 1997. Diffusion-edited NMR-affinity NMR for direct observation of molecular interactions, *J Am Chem Soc* 119, 5249–50.

LLEDO P. 1993. Variations in drug metabolism due to genetic polymorphism. *Drug Invest* 5, 19–34.

LOCKHART DJ, WINZELER EA. 2000. Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* 405, 827–36.

LORENZ WW, CORMIER MJ, O'KANE DJ, HUA D, ESCHER AA, SZALAY AA. 1996. Expression of the Renilla reniformis luciferase gene in mammalian cells. *J Biolumin Chemilumin* 11, 31–7.

LOVLIE R, DALY AK, MATRE GE, MOLVEN A, STEHEN VM. 2001. Polymorphisms in CYP2D6 duplicationnegative individuals with the ultrarapid metabolizer phenotype: a role for the CYP2D6*35 allele in ultrarapid metabolism? *Pharmacogenetics* 11, 45– 55.

MADIN K, SAWASAKI T, OGASAWARA T, ENDO Y. 2000. A highly efficient and robust cell-free protein synthesis system prepared from wheat embryos: plants apparently contain a suicide system directed at ribosomes. *Proc Natl Acad Sci* USA 97, 559–64..

MAHAJAN NP, LINDER K, BERRY G, GORDON GW, HEIM R, HERMAN B. 1998. Bcl–2 and Bax interactions in mitochondria probed with green fluorescent protein and fluorescence resonance energy transfer. *Nat Biotechnol* 16, 547–52.

MAITLAND-VAN DER ZEE A, KLUNGEI OH, STRICKER BHC, VERSCHUREN WMM, KASTELEIN JJP, LEUFKENS HGM, DE BOER A. 2002. Genetic polymorphisms: importance for response to HMG-CoA reductase inhibitors. *Atherosclerosis* 163, 213–22.

MAJERLE A, KIDRIC J, JERALA R. 2000. Production of stable isotope enriched. antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: an application to the production of a ^{15}N-enriched fragment of lactoferrin. *J Biomol NMR* 18, 145–51.

MALAKOFF D. The Rise of the Mouse, Biomedicine's Model Mammal. 2000. *Science* 288, 248–53.

MANNING AM. 1996. Transcription factors: a new frontier for drug discovery. *Drug Discov Today* 1, 151–60.

MAREZ D, LEGRAND M, SABBAGH N, GUIDICE JM, SPIRE C, LAFITTE JJ, MEYER UA, BROLY F. 1997. Polymorphism of the cytochrome P450 CYP2D6 gene in a European population: characterization of 48 mutations and 53 alleles, their frequencies and evolution. *Pharmacogenetics* 7, 193–202.

MARINISSEN MJ, GUTKIND JS. 2001. G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci* 22, 368–76.

MARLEY J, LU M, BRACKEN C. 2001. A method for efficient isotopic labeling of recombinant proteins. *J Biomol NMR* 20, 71-5

MARTEMYANOV KA, SHIROKOV VA, KURNASOV OV, GUDKOV AT, SPIRIN AS. 2001. Cell-free production of biologically active polypeptides: application to the synthesis of antibacterial polypeptide cecropin. *Protein Expr Purif* 21, 456–61.

MAYER M, MEYER B. 2001. Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor, *J Am Chem Soc* 123, 6108–17.

METZGER D, CHAMBON P. Site- and time-specific gene targeting in the mouse. 2001. *Methods* 24, 71–80.

MAYER TU, KAPOOR TM, HAGGARTY SJ, KING RW, SCHREIBER SL, MITCHISON TJ. 1999. Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen. *Science* 286, 971–4.

MEYER B, WEIMAR T, PETERS T. 1997. Screening mixtures for biological activity by NMR, *Eur J Biochem* 246, 705–9.

MEYER UA. 2000. Pharmacogenetics and adverse drug reactions. *Lancet* 356, 1667–71.

MICHEL H. 2001. Crystallization of membrane proteins, in: ROSSMANN MG, ARNOLD E, eds, *International Tables of Crystallography F: Macromolecular Crystallography*, 94–9, Kluwer, Dordrecht.

MICHIENZI A, CAGNON L, BAHNER I, ROSSI JJ, 2000, *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 8955–60.

MILLIGAN G, REES S. 1999. Chimaeric G alpha proteins: their potential use in drug discovery. *Trends Pharmacol Sci* 20, 118–24.

MITCHELL P. 2001. Turning the spotlight on cellular imaging. *Nat Biotechnol* 19, 1013–7.

MOORE JT, DAVIS ST, DEV IK. 1997. The development of beta-lactamase as a highly versatile genetic reporter for eukaryotic cells. *Anal Biochem* 247, 203–9.

MORIYA Y, NAKAMURA T, HORINOUCHI M, SAKAEDA T, TAMURA T, AOYAMA N, et al. 2002., Effects of polymorphisms of MDR1, MRP1, and MRP2 genes on their mRNA expression levels in duodenal enterocytes of healthy Japanese subjects. *Biol Pharm Bull* 25, 1356–9.

NAGY A, ROSSANT J, NAGY R, ABRAMOW-NEWERLY W, RODER JC. Derivation of completely cell culture derived mice from early-passage embryonic stem cells. 1993. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 8424–8.

NAKAMURA K, ARIYOSHI N, YOKOI T, OHGIYA S, CHIDA M, NAGASHIMA K, et al. 2002. CYP2D6.10 present in human liver microsomes shows low catalytic activity and thermal stability. *Biochem Biophys Res Commun* 293, 969–73.

NICHOLSON JK, CONNELLY J, LINDON C, HOLMES E. 2002. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. *Nat Rev Drug Discov* 1, 153–61.

NICHOLSON JK, LINDON JC, HOLMES E. 1999. ‘‘Metabonomics’’: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* 29, 1181–9.

NOWOTNY P, KWON JM, GOATE AM. 2001. SNP analysis to dissect human traits. *Curr Opin Neurobiol* 11, 637–41.

ORMO M, CUBITT AB, KALLIO K, GROSS LA, TSIEN RY, REMINGTON SJ. 1996. Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein. *Science* 273, 1392–5.

OUDE ELFERNIC R P,ZADINA J, 2001. MDR1 P-glycoprotein transports endogenous peptides. *Peptides,* 22:2015-2020.

PADAN E, HUNTE C, REILANDER H. 2003. Production and purification of recombinant membrane proteins, in: HUNTE C, VON JAGOW G, SCHÄGGER H, eds, *Membrane Protein Purification and Crystallizatio*n, 55–83, Elsevier Science, Amsterdam.

PAIGEN K. 1989. Mammalian betaglucuronidase: genetics molecular biology and cell biology. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 37, 155–205.

PALCZEWSKI K, KUMASAKA T, HORI T, BEHNKE CA, MOTOSHIMA H, FOX BA, LE TRONG I, TELLER DC, OKADA T, STENKAMP RE, YAMAMOTO M, MIYANO M. 2000. Crystal structure of rhodopsin: a G protein-coupled receptor. *Science* 289, 739–45.

PARSONS SJ, RHODES SA, CONNOR HE, REES S, BROWN J, GILES H. 2000.Use of a dual firefly and Renilla luciferase reporter gene assay to simultaneously determine drug selectivity at human corticotrophin releasing hormone 1 and 2 receptors. *Anal Biochem* 281, 187–92.

PELLETIER JN, CAMPBELL-VALOIS FX, MICHNICK SW. 1998. Oligomerization domain-directed reassembly of active dihydrofolate reductase from rationally designed fragments. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 12141–6.

PEREZ OD, NOLAN GP. 2002. Simultaneous measurement of multiple active kinase states using polychromatic flow cytometry. *Nat Biotechnol* 20, 155–62.

POLLOK BA, HEIM R. 1999. Using GFP in FRET-based applications. *Trends Cell Biol* 9, 57–60.

RAAMSDONK LM, TEUSINK B, BROADHURST D, ZHANG N, HAYES A, WALSH MC, BERDEN JA, BRINDLE KM, KELL DB, ROWLAND JJ, WESTERHOFF HV, VAN DAM K, OLIVER SG. 2000. A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations. *Nat Biotechnol* 19, 45–50.

RAM PT, IYENGAR R. 2001. G protein coupled receptor signaling through the Src and Stat3 pathway: role in proliferation and transformation. *Oncogene* 20, 1601–6.

RAO NN, LIESE A. 2004, Stereoselective synthesis with the help of recombinant enzymes in: DINGERMANN TH, STEINHILBER D, FOLKERS G. eds. *Molecular Biology in Medicinal Chemistry.* 125 -153, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

RAU T, HEIDE R, BERGMANN K, WUTTKE H, WERNER U, FEIFEL N, et al. 2002. Effect of the CYP2D6 genotype on metoprolol metabolism persists during long-term treatment. *Pharmacogenetics* 12, 465–72.

REICH DE, CARGILL M, BOLK S, IRELAND J, SABETI PC, RICHTER DJ, LAVERY T, KOUYOUMJIAN R, FARHADIAN SF, WARD R, LANDER ES. 2001. Linkage disequilibrium in the human genome. *Nature* 411, 199–204.

REMINGTON SJ. 2002. Negotiating the speed bumps to fluorescence. *Nat Biotechnol* 20, 28–9.

REMY I, MICHNICK SW. 1999. Clonal selection and in vivo quantitation of protein interactions with proteinfragment complementation assays. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 5394–9.

RENEGAR G, RIESER P, MANASCO P. 2001. Pharmacogenetics: the Rx perspective. *Expert Rev Mol Diagn* 1, 255–63.

ROBERTS G. 2000. Applications of NMR in drug discovery, *Drug Discov Today* 5, 230–40.

ROBERTSON JD, ORRENIUS S. 2000, Molecular mechanisms of apoptosis induced by cytotoxic chemicals, *Crit Rev Toxicol* 30, 609–27.

ROGERS JF, NAFZIGER AN, BERTINO JS., 2002. Pharmacogenetics affects dosing, efficacy and toxicity of cytochrome P450- metabolized drugs. *Am J Med*, 113: 746-750.

RONG YS, TITEN SW, XIE HB, GOLIC MM, BASTIANI M, BANDYOPADHYAY P, OLIVERA BM, BRODSKY M, RUBIN GM, GOLIC KG. Targeted mutagenesis by homologous recombination in D. melanogaster. 2002. *Genes Dev* 16, 1568–81.

ROSSANT J, NAGY A. Genome engineering: the new mouse genetics. 1995. *Nat Med* 1, 592–4.

SAENGER W, 1984, *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer Verlag, New York.

SAMER CF, PIGUET V, DAYER P, et al., 2005. Polymorphisme genetique et interaction medicamenteuses: leur importance dans le traitement de douleur. *Can J Anesth*, 52:806-821.

SARVER JG, KLIS WA, BYERS JP, ERHARDT PW. 2002. Microplate screening of the differential effects of test agents on Hoechst 33342, rhodamine 123, and rhodamine 6G accumulation in breast cancer cells that overexpress Pglycoprotein. *J Biomol Screen* 7, 29–34.

SAUTEL M, MILLIGAN G. 2000. Molecular manipulation of G-proteincoupled receptors: a new avenue into drug discovery. *Curr Med Chem* 7, 889–96.

SCHAAP AP, AKHAVAN H, ROMANO LJ. 1989. Chemiluminescent substrates for alkaline phosphatase: application to ultrasensitive enzyme-linked immunoassays and DNA probes. *Clin Chem* 35, 1863–4.

SCHAUFELE F. 2001. Shedding light on molecular timing. *Nat Biotechnol* 19, 21–2.

SCHERR M, REED M, HUANG C-F, RIGGS AD, ROSSI JJ, 2000, *Mol Therapy* 2, 26–38.

SCHLESSINGER J. 1993. Cellular signaling by receptor tyrosine kinases. *Harvey Lect* 89, 105–23.

SCORDO MG, AKLILLU E, YASAR U, et. al., 2001. Genetic poymorphism of cytochrome P450 2C9 in a caucasian and a black African population. *Br J Cin Pharmacol*, 52: 447-450.

SCORDO MG, SPINA E, ROMEO P, DAHL ML, BERTILSSON L, JOHANSSON I, et al. 2000. CYP2D6 genotype and antipsychotic-induced extrapyramidal side-effects in schizophrenic patients. *Eur J Clin Pharmacol* 56, 679–83.

SCRIBA G. 2004, Affinity chromatography in: DINGERMANN TH, STEINHILBER D, FOLKERS G. eds. *Molecular Biology in Medicinal Chemistry.* 211 - 242, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

SHAPIRO M, WAREING J. 1998. NMR methods in combinatorial chemistry, *Curr Opin Chem Biol* 2, 372–5.

SHARKE K, JARRAR M, SCHMIDT H, et al., 2003.ABCB1 (multidrug resistance transporter) gene mutations on disposition and central nervous effects of loperamide in healthy volunteers. *Pharmacogenetics*, 74:651-660.

SHI MM, BLEAVINS MR, DE LA IGLESIA FA. 2001. Technologies for detecting genetic polymorphisms in pharmacogenomics. *Drug Metab Dispos* 29, 591–5.

SHINDERMAN M, MAXWELL S, BRAWAND-AMEY M, et al., 2003. Cytochrome p450 3A4 metabolic activity, methadone blood concentrations, and methadone doses. *Drug Alcohol Dependence,* 69: 205-211.

SHINTANI M, IEIRI I, INOUE K, et al., 2001. Genetic polymorphysms and functional characterization of the 5'- flanking region of the human CYP2C9 gene: in vitro and in vivo studies. *Clin Pharmacol Ther* 70: 175-182.

SHIROKOV V, SIMONENKO PN, BIRYUKOV SV, SPIRIN AS. 2002. Continuous-flow and continuous exchange cell-free translation systems and reactors. In Spirin AS, ed., *Cell free Translation Systems*, 91–108, Springer, Berlin.References 299

SHUKER SB, HAJDUK PJ, MEADOWS RP, FESIK SW. 1996. Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR, Science 274, 1531–4.

SIGURDSSON STH, THOMSON JB, ECKSTEIN F, IN: RW SIMONS, M GRUNBERG-MANAGO, 1998, eds, *RNA Structure and Function*, 339–76, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY

SIMON MA. 2000. Receptor tyrosine kinases: specific outcomes from general signals. *Cell* 103, 13–5.

SINDRUP SH, BRØSEN K. 1996. The pharmacogenetics of codeine hypoalgesia. *Pharmacogenetics* 10, 335–46.

SINGH M, O'HAGAN DT. 2002. Recent advances in vaccine adjuvants, *Pharm Res* 6, 715–28.

SMITHIES O. Animal models of human genetic diseases. 1993. *Trends Genet* 9, 112–16.

SNYDER LH. 1932. The inheritance of taste deficiency in man. *Ohio J Sci* 32, 436–68.

SOMOGYI R, GRELLER LD. 2001. The dynamics of molecular networks: applications to therapeutic discovery. *Drug Discov Today* 6, 1267–77.

SONOYAMA T, TANI H, MATSUDA K, KAGEYAMA B, TANIMOTO M, KOBYASHI K, YAGI S, KYOTANI H, MITSUSHIMA K. 1982. *Appl Environ Microbiol* 43, 1064–9.

SORKIN A, MCCLURE M, HUANG F, CARTER R. 2000. Interaction of EGF receptor and grb2 in living cells visualized by fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy. *Curr Biol* 10, 1395–8.

SPINA E, GIOTTO C, AVENOSO A, CAMPO GM, et al., 1997. Relationship between plasma desipramine levels, CYP2D6 phenotype and clinical response to desipramine: a prospective study. *Eur J Clin Pharmacol,* 51:395-398.

STEPHANOPOULOS G, KELLEHER J. 2001. Biochemistry. How to make a superior cell. *Science* 292, 2024–5.

STEPHANOPOULUS GN, ARISTIDOU AA, NIELSEN J. 1998. *Metabolic Engineering – Principles and Methodologies*, Academic Press, San Diego, CA.

STOCKMANN B, DALVIT C. 2002. NMR screening techniques in drug discovery and drug design, *Prog Nucl Magn Spectrosc* 41, 187–231.

STRATOWA C, HIMMLER A, CZERNILOFSKY AP. 1995. Use of a luciferase reporter system for characterizing G-protein-linked receptors. *Curr Opin Biotechnol* 6, 574–81.

STRAUB B, MEYER E, FROMHERZ P. 2001. Recombinant maxi-K channels on transistor, a prototype of ionoelectronic interfacing. *Nat Biotechnol* 19, 121–124.

STREETMAN D S, BERTINO J S JR, NAFZIGER A N, 2000.Phenotyping of drug-metabolizing enzyme In adults: a review of in vivo cytochrome P450 phenotyping probes. *Pharmacogenetics,* 10:187-216.

SUBRAMANIAM R, DESVEAUX D, SPICKLER, MICHNICK SW, BRISSON N. 2001. Direct visualization of protein C interactions in plant cells. *Nat Biotechnol* 19, 769–72.

SULLIVAN E, TUCKER EM, DALE IL. 1999. Measurement of [$Ca2^+$] using the Fluorometric Imaging Plate Reader (FLIPR). *Methods Mol Biol* 114, 125–33.

SWYNGHEDAUW B. 2001. Cardiovascular pharmacogenetics and pharmacogenomics. *J Clin Basic Cardiol* 4, 205–10.

SYKES B. 1994. Interaction of transforming growth factor-a with the epidermal growth factor receptor: binding kinetics and differential mobility within the bound TGF-a, *Biochemistry* 33, 15283–92.

TAMMINGA WJ, WERNER J, OOSTERHUIS B, BRAKENHOFF JPG, GERRITIS MGF, DE ZEEUW RA, DE LEIJ LF, JONKMAN JH. 2001. An optimized methodology for combined phenotyping and genotyping on CYP2D6 and CYP2C19. *Eur J Clin Pharmacol* 57, 143–6.

TAN S, HALL IP, DEWAR J, DOW E, LIPWORTH B. 1997. Association between beta 2 adrenoceptor polymorphism and susceptibility to bronchodilator desensitisation in moderately severe stable asthmatics. *Lancet* 350, 995–9.

THOMAS KR, CAPECCHI MR. Site directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. 1987. *Cell* 51, 503–12.

THOMAS RS, RANK DR, PENN SG, ZASTROW GM, HAYES KR, PANDE K, GLOVER E, SILANDER T, CRAVEN MW, REDDY JK, JOVANOVICH SB, BRADFIELD CA. 2001. Identification of toxicologically predictive gene sets using cDNA microarrays. *Mol Pharmacol* 60, 1189–94.

THORISSON GA, STEIN LD. 2003. The SNP Consortium website: past, present and future. *Nucleic Acids Res* 31, 124–7.

TSIEN RY. 1998. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 67, 509– 44.

TSUJI Y et al., 2000, Coordinate transcriptional and translational regulation of ferritin in response to oxidative stress, *Mol Cell Biol*, 20, 5818–27.

TSUNEOKA Y, MATSUO Y, IWAHASHI K, TAKEUCHI H, ICHIKAWA Y. 1993. A novel cytochrome P-450ID6 mutant gene associated with Parkinson's disease. *J Biochem* 114, 263–6.

TUCKER CL, FIELDS S. 2001. A yeast sensor of ligand binding. *Nat Biotechnol* 19, 1042–6.

TULIN EE, KEN-ICHI T, SHIN-ICHIRO E. 1995. Continuously coupled transcription-translation system for the production of rice cytoplasmic aldolase. *Biotechnol Bioeng* 45, 511–6.

UDVADIA AJ, LINNEY E. Windows intodevelopment: historic, current, and future perspectives on transgenic zebrafish. 2003. *Dev Biol* 256, 1–17.

UINGS IJ, FARROW SN. 2000. Cell receptors and cell signaling. *Mol Pathol* 53, 295–9.

VAN DEN BURG HA, DE WIT PJGM, VERVOORT J. 2001. Efficient $^{13}C/^{15}N$ double labeling of the avirulence protein AVR4 in a methanol-utilizing strain (Mut^+. of *Pichia pastoris. J Biomol NMR* 20, 251–61.

VENTER JC, et al. 2001. The sequence of the human genome, *Science* 291, 1304–51.

VENTURI M, HUNTE C. 2003. Monoclonal antibodies for the structural analysis of the Na+/H+ antiporter NhaA from *Escherichia coli, Biochim Biophys Acta Biomembr* 1610, 46–50.

VENTURI M, SEIFERT C, HUNTE C. 2002. High level production of functional antibody Fab fragments in an oxidizing bacterial cytoplasm, *J Mol Biol* 315, 1–8.

VERSTUYFT C, SCHWAB M, SCHAEFFELER E, KERB R, BRINKMANN U, JAILLON P, et al., 2003, Digoxin pharmacokinetics and MDR1 genetic polymorphisms. *Eur J Clin Pharmacol* 58, 809–12.

VOGT A, ADACHI T, DUCRUET AP, CHESEBROUGH J, NEMOTO K, CARR BI, LAZO JS. 2001. Spatial analysis of key signaling proteins by high-content solid-phase cytometry in Hep3B cells treated with an inhibitor of Cdc25 dual-specificity phosphatases. *J Biol Chem* 276, 20544–50.

VOGTHERR M, PETERS P. 2000. Application of NMR based binding assays to identify key hydroxy groups for intermolecular recognition, *J Am Chem Soc* 122, 6093–9.

WARREN MK, ROSE WL, BEALL LD, CONE J. 1995. $CD34^+$ cell expansion and expression of lineage markers during liquid culture of human progenitor cells. *Stem Cells* 13, 167–74.

WEINBERGER SR, DALMASSO EA, FUNG ET. 2002. Current achievements using Protein Chip Array technology. *Curr Opin Chem Biol* 6, 86–91.

WELSH S, KAY SA. 1997. Reporter gene expression for monitoring gene transfer. *Curr Opin Biotechnol* 8, 617–22.

WHITE MA. 1996. The yeast twohybrid system: forward and reverse. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 10001–3.

WORMHOUDT LW, COMMANDEUR JN, VERMEULEN NP. 1999. Genetic polymorphisms of human N-acetyltransferase, cytochrome P450, glutathione-S-transferase, and epoxide hydrolase enzymes: relevance to xenobiotic metabolism and toxicity. *Crit Rev Toxicol* 29, 59–124.

WUTTKE H, RAU T, HEIDE R, BERGMANN K, BOHM M, WEIL J, et al.2002. Increased frequency of cytochrome P450 2D6 poor metabolizers among patients with metoprolol-associated adverse effects. *Clin Pharmacol Ther* 72, 429–37.

XING H, TRAN H, KNAPP TE, NEGULESCU PA, POLLOK BA. 2000. A fluorescent reporter assay for the detection of ligands acting through Gi protein-coupled receptors. *J Recept Signal Transduct Res* 20, 189–210.

XING H, TRAN HC, KNAPP TE, NEGULESCU PA, POLLOK BA. 2000. A fluorescent reporter assay for the detection of ligands acting through Gi protein-coupled receptors. *J Recept Signal Transduct Res* 20, 189–210.

XU JZ, WANG X, ENSIGN B, LI M, WU L, GUIA A, XU J. 2001. Ion-channel assay technologies: quo vadis? *Drug Discov Today* 6, 1278–87.

ZABIN I. 1982. A model of protein interaction. *Mol Cell Biochem* 49, 87– 96.

ZAIGLER M, TANTCHEVA-POOR I, FUHR U. 2000. Problems and perspectives of phenotyping for drug-metabolizing enzymes in man. *Int J Clin Pharmacol Ther* 37, 1–9.

ZANGER UM, FISCHER J, RAIMUNDO S, STUVEN T, EVERT BO, SCHWAB M, et al. 2001. Comprehensive analysis of the genetic factors determining expression and function of hepatic CYP2D6. *Pharmacogenetics* 11, 573–85.

ZANGER UM, RAIMONDO S, EICHELBAUM M, 2004. Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 369:23-37.

ZHANG H, HASTY P, BRADLEY A. Targeting frequency for deletion vectors in embryonic stem cells. 1994. *Mol Cell Biol* 14, 2404–10.

ZHOU H, TONG Z, MCLEOD J F, 2004. "Cocktail" approaches and strategies in drug development: valuable tool or flwedscience? *J Clin Pharmacol* 44:120-134.

ZHOU P, LUGOVSKOY AA, WAGNER G. 2001. A solubility-enhancement tag (SET) for NMR studies of poorly behaving proteins. *J Biomol NMR* 20, 11–4.

ZHU HJ, BURGESS AW. 2001. Regulation of transforming growth factor-beta signaling. *Mol Cell Biol Res Commun* 4, 321–30.

ZHU M, FAHL WE. 2000. Development of a green fluorescent protein microplate assay for the screening of chemopreventive agents. *Anal Biochem* 287, 210–7.

ZLOKARNIK G, NEGULESCU PA, KNAPP TE, MERE L, BURRES N, FENG L, WHITNEY M, ROEMER K, TSIEN RY. 1998. Quantitation of transcription and clonal selection of single living cells with beta-lactamase as reporter. *Science* 279, 84–8.

ZSCHIESCHANG P, HIEPE F, GROMNICA-IHLE E, ROOTS I, CASCORBI I., 2002. Lack of association between arylamine N-acetyltransferase 2 (NAT2) polymorphism and systemic lupus erythematosus. *Pharmacogenetics* 12, 559–63.

ZUHLSDORF MT. 1998. Relevance of pheno- and genotyping in clinical drug development. *J Clin Pharmacol Ther* 36, 607–12.